EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
JUL 6 '55

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

E. L. Boné: The Influence of General Body Size on the Body Proportions in Man and Other Primates 169

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

Sarah Deutsch, D. Hirschberg et E. Picciotto: Mesure des âges géologiques par les halos pléochroïques . . . 172
S. Fallab und H. Erlenmeyer: Kationengleichgewichte in biologischen Systemen 174
H. I. Hadler: The Steric Course of Hydrogenation of Δ^4 and Δ^5 Steroids 175
G. Ludány und Gy. Vajda: Die Wirkung der Nukleinsäuren auf die Bakterienphagozytose der Leukozyten. . . 177
A. Frey-Wyssling und P. Waltz: Der Atmungsquotient der Tabakblätter 178
F. T. Wolf and F. A. Wolf: The Carotenoid Pigments of the Cedar Apple Rust Fungus 179
R. Meier, B. Schär und F. Kradolfer: Antagonistische Wirkung von Mucoprotein Gottschalk gegenüber Shearschem Polysaccharid an isolierten Zellen 180
Stien Voogd: Inhibition of Ovary Development in Worker Bees by Extraction Fluid of the Queen 181
E. C. Griesemer, C. A. Dragstedt, J. A. Wells, and E. A. Zeller: Adrenergic Blockade by Iproniazid 182
M. Gordon: Utilization of Exogenous Adenine by the Rat 183
A. Marxer: Über ein carcinostatisch wirksames Hydrochinonderivat 184
P. Loustalot, B. Schär und R. Meier: Über antimitotische und tumorhemmende Eigenschaften des inneren Salzes des 2,5-Bis-Äthylenimino-hydrochinons 186
R. Ruyssen et H. Anciaux: La vitesse d'incorporation du C^{14} dans les acides gras chez la souris 187
D. Boulter and A. Burges: Oxidases of *Polystictus versicolor* 188
K. Eiter: Über den Umsatz von Anthranilsäure mit Brenztraubensäure 189
S. Karasaki and T. Yamada: Morphogenetic Effects of Centrifugation on the Isolated Ectoderm and Whole Embryo of Some Anurans 191
O. M. Gordon, K. O. Donaldson, and L. M. Marshall: On Phosphorylation in Brain Tissue in the Chick . . . 194
Ch. Jeuniaux et M. Amanieu: Propriétés chitinolytiques du liquide exuvial du ver à soie (*Bombyx mori* L.) . . 195
L. de Caro and G. Rindi: On the Metabolic Significance of Blood Pyruvate in B_1 Avitaminosis 196
W. Kobinger, O. Kraupp, H. Stormann und G. Werner: Freisetzung von Kalium aus denerviertem und innerviertem Skelettmuskel durch Acetylcholin 197
M. Nicely: Measurement of the Potential Difference Across the Connective Tissue Sheath of Frog Sciatic Nerve 199
H. Bornschein und F. Krejci: Über einen Bahnungseffekt bei sukzessiver Einwirkung von vestibulären und optokinetischen Reizen 200
F. Papi: Experiments on the Sense of Time in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda) 201
L. Pardi and M. Grassi: Experimental Modification of Direction-Finding in *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia deshayesei* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda) 202

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: S. Markees: Über die Genauigkeit der Brenztraubensäure-Bestimmung als 2,4-Dinitrophenylhydrazon 205

mit der Zeit gehen
heisst die Devise des fortschrittlichen Chemikers. Er bevorzugt deshalb die nach den modernsten Grundsätzen konstruierte METTLER Analysenwaage. Das Prinzip der konstanten Belastung gewährleistet maximale Genauigkeit. Verlangen Sie bitte eine unverbindliche Demonstration.
Mettler
ANALYSENWAAGE
E. METTLER ZÜRICH 1 SCHWEIZ PELIKANSTR. 19
TEL. (051) 25 25 70

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XI/5

Artia, Prague
Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Lonza AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Salvis AG., Luzern
Sandoz AG., Basel
Fr. Sauter AG., Basel
Verlag Chemie, Weinheim

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de postes des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.– $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

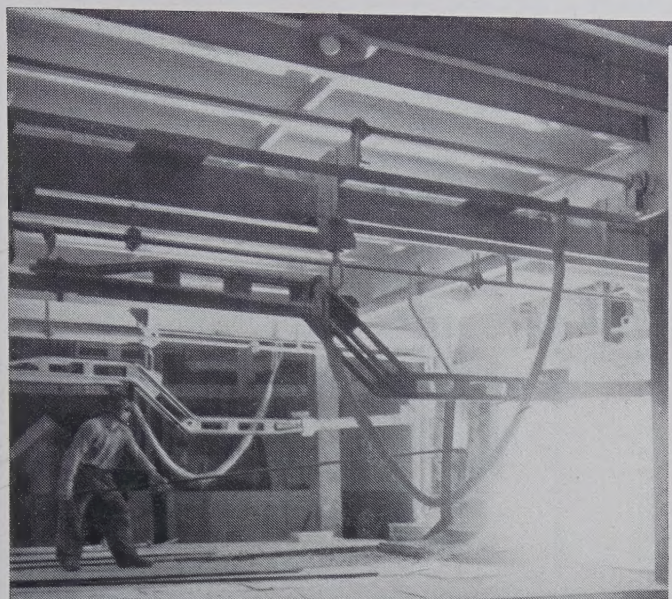
EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero sfr. 46.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.–; other countries sfr. 46.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1955 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telephon (061) 24 98 00; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel



LONZA

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und Schweisszwecke

Metallegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium, Ferro-Silico-Aluminium, Ferro-Silico-Aluminium-Mangan, Silicium-Calcium-Aluminium, Calciumsilicium

Graphit

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar (Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Dicyandiamid, Guanidinnitrat, Ammoniak, Salpetersäure, Nitriersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harnstoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl, Vinylacetat monomer

Organische Lösungsmittel: Aceton, Aethylacetat, Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate, Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat

Vinylharze: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Mischpolymerisate

ELEKTRIZITÄTSWERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

ARTIA

Collection of Czechoslovak Chemical Communications

(Begründet von E. Votoček und J. Heyrovský)

In der Zeitschrift werden ausgewählte Arbeiten aus der tschechoslowakischen Zeitschrift Chemické listy auf dem Gebiet der Chemie und Biochemie in deutscher, englischer oder russischer Übersetzung veröffentlicht. Ausser diesen ungekürzten Originalmitteilungen wird über eine Reihe weiterer, nur in tschechischer Sprache veröffentlichter Arbeiten ausführlich referiert. Ein Jahrgang, bestehend aus 6 Heften, hat einen Umfang von etwa 1600 Seiten. Als Beilage enthält die Zeitschrift einmal jährlich ein vollständiges Verzeichnis aller Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Polarographie.

Jährlicher Bezugspreis $ 8,50 oder Gegenwert in anderer Währung. Bestellungen können durch jede Buchhandlung oder bei Artia, 30 Ve Smečkách, Prague (Tschechoslowakei), erfolgen.

Redaktionskomitee

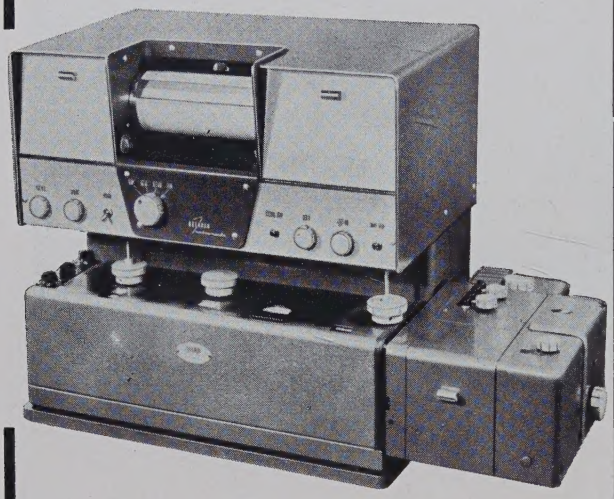
R. Brdička, J. Gašperík, V. Herout, J. Heyrovský, V. Hovorka, B. Keil, J. Koštíř, R. Lukeš, A. Okáč, J. Plíva, M. Protiva, J. Rudinger, J. Sicher, M. Streibl (Redaktor), E. Šorm (Vorsitzender), O. Wichterle, P. Zuman.

Neu!

BECKMAN-

MODELL DR

Automatik-Zusatz zum
Quarz-Spektralphotometer
Modell DU



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1–3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 mμ bis 1000 mμ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

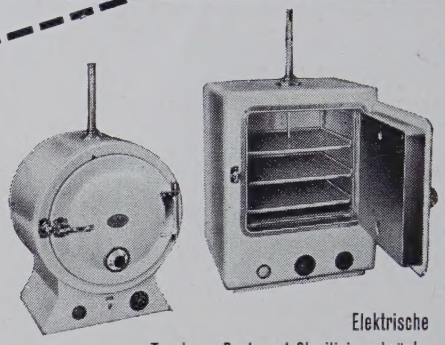
Auskünfte, Beratung und Angebote durch

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

Elektrische Wärmegeräte
für Laboratorien



Elektrische
Trocken-, Brut- und Sterilisierschränke

Salvis

SALVIS AG. Luzern-Emmenbrücke
Fabrik elektrischer Apparate

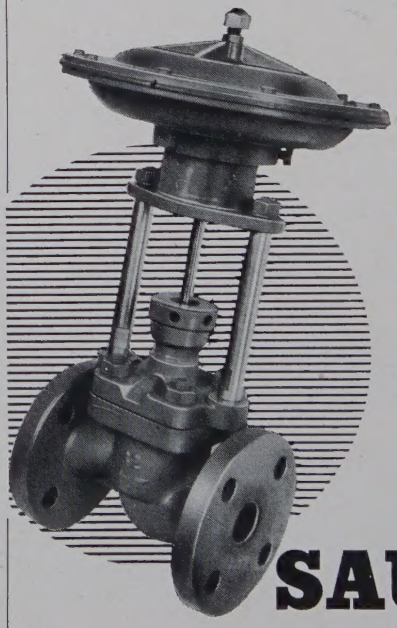
Pneumatische Regelungen für

Heizung

Lüftung

Klima-

anlagen



SAUTER

Fr. Sauter AG., Fabrik elektr. Apparate, Basel

EXPERIENTIA

Vol. XI - Fasc. 5 Pag. 169–208 15. V. 1955

The Influence of General Body Size on the Body Proportions in Man and Other Primates[1]

By E. L. Boné (Louvain[2], Belgium)

The relation between general body size and the size of bodily parts began to be investigated about two centuries ago by Robinson[3] and by von Haller[4] who can be considered the discoverers of the laws of allometric growth. Soon it could be clearly demonstrated that, e.g., brain weight and the volume of the heart and of the eyes retain no constant relation to body size, but become proportionately smaller with increase in the general size of the animal, also in the small young these organs are relatively larger than in corresponding fully grown specimens. During the last 60 years, a great many papers have appeared dealing with allometric problems. Huxley[5], Hammond[6], Latimer and Aikman[7], Teissier[8], and Schultz[9] have studied some phases of this problem, while d'Arcy Thompson[10], Hersch[11], Robb[12], Osborn[13], Lumer[14], Gray[15], and others have dealt chiefly with its phylogenetic aspects. Haller's allometric law, expressing the relative reduction of the parts in relation to increasing body size, has been tested for many structures, e.g. for the brain weight by Cuvier[16], Snell[17], Keith[18], Dubois[19], Lapicque[1], Pearl[2], Oppenheim[3], Hrdlička[4], Weber[5], Weinert[6], von Bonin[7], Grimm[8], Crile and Quiring[9], Schultz[10], Portmann[11], Count[12], Wirz[13], Anthony[14], Goosen[15], and Malthaner[16]; for the eyeball and the orbit by Welcker and Brandt[17], Lapicque[18], Klatt and Vorsteher[19], Schultz[20], Rensch[21], and Möller[22]; for the endocrine glands by Padour[23]; and for the visceral organs, hair and feathers of different animals by Richet[24], Manea[25], Parrot[26], Maurel[27], Welcker and Brandt[28], Kestner and Plaut[29], Klatt[30], Denzer[31] Quiring[32], and Rensch[33].

[1] This work has been executed in the Anthropological Institute of the University of Zürich.

[2] Permanent address: Département des Sciences, Collège Philosophique St-Albert, Louvain (Belgium).

[3] B. Robinson, *Diss. on the Food and Discharge of Human Bodies* (London, 1748).

[4] A. von Haller, *Elementa Physiologiae Corporis Humani*, T. 4 (Lausanne, 1762).

[5] J. S. Huxley, Amer. Natural *58*, 468 (1924); *65*, 289 (1931); *Problems of Relative Growth* (New York, 1932).

[6] J. Hammond, Verh. intern. Kongress Vererbungswiss. Berlin 1927, *2*, 769 (1928); Z. Züchtungskde. *4*, 543 (1929).

[7] H. B. Latimer and J. M. Aikman, Anat. Rec. *58*, 1 (1931).

[8] G. Teissier, *Dysharmonies et Discontinuités de la Croissance* (Hermann, Paris, 1934); Biometrics *4*, 14 (1948).

[9] Ad. H. Schultz, Amer. J. Phys. Anthropol. *26*, 389 (1940); *28*, 273 (1941).

[10] W. d'Arcy Thompson, *Growth and Form* (Cambridge, 1917).

[11] A. H. Hersch, Amer. Natural. *68*, 537 (1934).

[12] R. C. Robb, J. Genetics *31*, 39 (1935); *33*, 267 (1936); *34*, 477 (1937).

[13] H. F. Osborn, Palaeobiol. *6*, 273 (1938).

[14] H. Lumer, Amer. Natural. *74*, 439 (1940).

[15] St. W. Gray, Amer. J. Sci. *244*, 792 (1946).

[16] G. Cuvier, *Leçons d'anatomie comparée* (Paris, 1805).

[17] O. Snell, Arch. Psychiatr. *23*, 436 (1891).

[18] A. Keith, J. Anat. Physiol. *29*, 282 (1895).

[19] E. Dubois, Arch. Anthropol. *25*, 1 (1897); *25*, 423 (1898).

[1] L. Lapicque, C. r. Soc. Biol. Paris *5*, 62 (1898); Bull. Mém. Soc. Anthropol. Paris *5*, 313 (1907); C. r. Acad. Sci. Paris *147*, 209 (1908); Bull. Mus. Hist. natur. Paris *7*, 408 (1909).

[2] R. Pearl, Biometrika *4*, 13 (1905).

[3] St. Oppenheim, Z. Morphol. Anthropol. *14*, 1 (1912).

[4] A. Hrdlička, Amer. J. Phys. Anthropol. *8*, 201 (1925).

[5] M. Weber, *Die Säugetiere* (Jena, 1927).

[6] H. Weinert, *Ursprung der Menschheit* (Stuttgart, 1932).

[7] G. von Bonin, J. Gener. Psychol. *16*, 379 (1937).

[8] J. Grimm, Z. Rassenkde. *9*, 6 (1939).

[9] C. Crile and D. P. Quiring, Ohio J. Sci. *40*, 219 (1940).

[10] Ad. H. Schultz, Amer. J. Phys. Anthropol. *28*, 273 (1941).

[11] A. Portmann, Alauda *14*, 1 (1946); *15*, 161 (1947); Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. (1952).

[12] E. W. Count, Ann. N. Y. Acad. Sci. *46*, 993 (1947).

[13] K. Wirz, Acta Anat. *9*, 134 (1950).

[14] J. Anthony, Mammalia *15*, 53 (1951); *15*, 124 (1951).

[15] H. Goosen, Zool. Jahrb. Abt. allg. Zool. Physiol. *62*, 1 (1951).

[16] H. Malthaner, Säugetierkundl. Mitt. *1*, 5 (1953).

[17] H. Welcker and A. Brandt, Arch. Anthropol. *28*, 1 (1903).

[18] L. Lapicque, C. r. Acad. Sci. Paris *147*, 209 (1908); C. r. Acad. Sci. Paris *151*, 47 (1910).

[19] B. Klatt and H. Vorsteher, Bibl. Genetica *6* (1923).

[20] Ad. H. Schultz, Amer. J. Phys. Anthropol. *26*, 389 (1940).

[21] B. Rensch, Zool. Jb. Abt. Allg. Zool. Physiol. *61*, 337 (1948).

[22] A. Möller, Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. *62*, 138 (1951).

[23] L. Padour, Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. *62*, 102 (1950).

[24] Ch. Richet, C. r. Soc. Biol. Paris *3*, 405 (1891).

[25] L. Manea, G. Med. vet. *43*, 76 (1894).

[26] C. Parrot, Zool. Jb. Abt. System. *7*, 496 (1894).

[27] E. Maurel, C. r. Acad. Sci. Paris *135*, 1002 (1902); *136*, 316 (1903); *137*, 196 (1903)

[28] H. Welcker and A. Brandt, Arch. Anthropol. *28*, 1 (1903).

[29] O. Kestner and R. Plaut, in: Winterstein, *Handbuch der vergleichenden Physiologie* (Jena, 1914).

[30] B. Klatt, Biol. Zbl. *39*, 406 (1919).

[31] H. Denzer, Diss.: *Vergleichend-messende Untersuchungen an Säugetieren* (Würzburg, 1935).

[32] D. P. Quiring, Growth *2*, 335 (1939).

[33] B. Rensch, Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. *61*, 337 (1948).

In spite of so many investigations dealing with different aspects of allometry, the influence of general body size on the relative dimensions of the parts within homogenous groups or definite species deserves further study, particularly in man. Relevant observations were undertaken by Pfitzner[1], Bertillon[2], Hansen[3], Manouvrier[4], Harris[5], and Bach[6], but without very definite conclusions.

The writer has attempted to analyze the influence of body size on the size of a considerable number of different bodily dimensions in a very extensive series of human beings and in some other primates. This study, which promised to have a significant bearing on many anthropological problems, was undertaken at the suggestion and with the help of the writer's teacher, Prof. Adolph H. Schultz, in the Anthropological Institute of the University of Zürich. In this greatly condensed English abstract of the work, published in detail (and in French) elsewhere[7], only the most essential facts, methods and results will be enumerated as follows: The entire analysis is based on measurements on a total of 68,040 adult individuals belonging to 63 human populations, roughly two thirds male and one third female, and measurements on a total of slightly over 400 monkeys and apes. This entire mass of data had been exclusively collected by others and for different purposes; a large part could be obtained from the literature and a smaller, unpublished part had very kindly been placed at the writer's disposal by a number of anthropologists. It seems certain, therefore, that all these individual measurements are free from any subconscious idea of allometry. Determined by the nature of the available data, this study deals chiefly with homogenous groups of adult man, while ontogenetic as well as phylogenetic questions could be investigated in only a preliminary way. The following measurements were selected for analysis: sitting height, trunk height, length of limbs and of all main limb segments, breadths of shoulders, hips and pelvis, total and upper face height, nose height, head length, and head breadth, or whenever given as such, mean head diameter. For a variety of good reasons, stature was considered as meaningless or as even misleading for the purposes of this study in which sitting height represents a far more suitable measure of body size. The absolute measurements of the bodily parts were all calculated by the writer from the original data in percentage of the trunk height.

Every population was scaled according to increasing sitting height. The indices of the segments S have been calculated as $S \cdot 100/T$ (T = trunk height). In order to distinguish any modification of the index, i.e. its increase or decrease from one extreme size-class of the population to the other extreme size-class, each population has been divided into 4 groups of an equal number of individuals, in such a manner that the first (I) of them contains the smallest sitting heights, the fourth one (IV) the largest. In each group and for every dimension referred to, the average index has been calculated. The indices compared furnish a quantitative expression of the modification of the segment under consideration throughout the population, in relation to its increasing general body size. The difference between the average indices I and IV shows in some few instances an increase or, more generally, a decrease of a few units. In order to compare various segments and their reciprocal modifications, this difference had to be put in relation to the absolute value of the corresponding index according to the following formula:

$$100 \frac{\frac{S_I \cdot 100}{T_I} - \frac{S_{IV} \cdot 100}{T_{IV}}}{\frac{S_I \cdot 100}{T_I}} = \frac{100\, T_I}{S_I} \left(\frac{S_I}{T_I} - \frac{S_{IV}}{T_{IV}} \right)$$

This expression, which was called "Growth reductional coefficient" or G.R.C., has been provided with a positive or negative sign, according to the increase or the decrease of the indices respectively.

A generally valid, negative or decreasing allometry has been clearly demonstrated in 42 human adult populations, and for 17 proportions. It was present in 94·88% of all the cases, and the G.R.C. averages −4·873. Increasing sitting height causes an evident decrease of the relative dimensions of many parts of the body. This reduction is most pronounced in head and face dimensions. Next come the lower and upper extremities with their parts: the distal segments (foot and hand) are in all cases more affected than the proximal (thigh and upperarm), and these are more affected than the intermediate ones (leg and forearm). These results confirm mathematically, and by new evidence, the old observation of the important role of the distal segment of the caudal extremity in increasing body size. The relative breadth of the pelvis is the least reduced dimension, although it, too, shows a marked reduction.

Evidence of a sexual difference in reference to this problem is not clearly present in human populations. In the Figure, the two lines for both sexes of the average G.R.C. are very near each other at most places. However, the size of some coefficients seems to indicate a sexual influence. The reduction of relative dimensions with increasing sitting height is less pronounced among women in several segments of the lower extremity, but

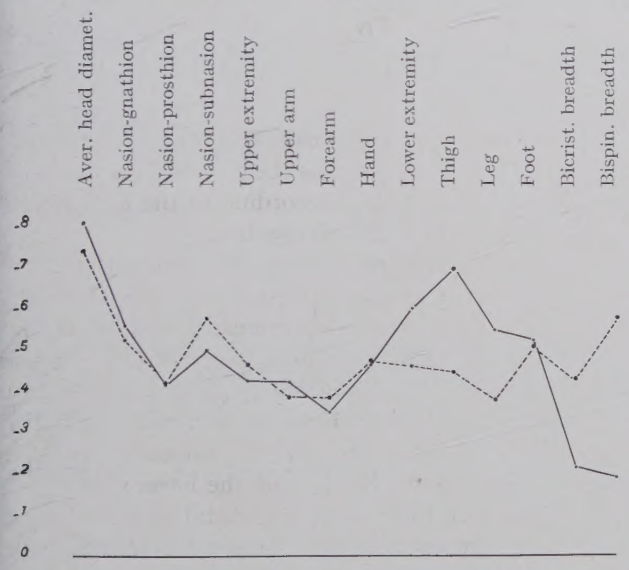
[1] W. Pfitzner, Morphol. Arbeit. *2*, 93 (1893); *7*, 473 (1897); Z. Morphol. Anthropol. *3*, 485 (1901); *5*, 201 (1903).
[2] A. Bertillon, Rev. Sci. Paris *17*, 524 (1889).
[3] S. Hansen, Arch. Anthropol. *20*, 321 (1892).
[4] L. Manouvrier, Bull. Mém. Soc. Anthropol. Paris *2*, 1 (1902).
[5] J. A. Harris, Amer. Natural. *58*, 254 (1924).
[6] F. Bach, Z. Konst. *12*, 469 (1926); *13*, 219 (1927); *16*, 28 (1932).
[7] *L'influence de la hauteur du buste sur l'allométrie des segments particuliers chez l'homme et divers autres primates*, Arch. suisses Anthropol. gén. (Geneva), *18*, 1–192 (1953), 79 tables, 19 figures.

Table I.–Average Growth reductional coefficients in human adult populations with reference to sex and race

Sex	Race	Total Upper extremity	Upper-arm length	Fore-arm length	Hand length	Total lower extremity	Thigh length	Leg length	Foot length	Bis-spinal breadth	Bi-cristal breadth	Average Head diam.[2]	Total Face height	Upper Face height	Nose height	Average G.R.C.[3]
♂	Whites . . .	– 6·85	– 5·81	– 5·29	– 5·73	– 4·30	– 4·87	– 5·45	– 6·34	– 6·79	– 5·55	– 8·01	– 7·16	– 5·85	– 6·18	– 6·06 (74)
	Negroids . .	– 3·31	– 2·51	– 3·10	– 3·62	– 3·62	– 2·68	– 1·90	– 4·46	– 3·77	– 3·94	– 7·43	– 4·42	– 3·60	– 6·07	– 4·09 (83)
	All populations[1]	– 4·64	– 3·87	– 3·83	– 4·77	– 4.63	– 4·49	– 3·82	– 5·12	– 5·84	– 4·36	– 7·42	– 5·26	– 4·21	– 5·80	– 4·86 (204)
♀	Whites . . .	– 5·04	– 4·84	– 5·49	– 4·22	– 3·27	– 7·03	– 5·78	– 5·41	– 4·97	– 4·30	– 7·55	– 5·59	– 5·51	– 4·97	– 5·43 (59)
	All populations[1]	– 4·31	– 4·26	– 3·51	– 4·65	– 6·05	– 7·03	– 5·78	– 5·30	– 1·93	– 2·14	– 8·08	– 5·59	– 4·13	– 4·97	– 4·88 (89)

[1] Including other populations besides Whites and Negroids.
[2] (Length + Breadth)/2.
[3] In parenthesis, the number of calculated Growth reductional coefficients.

more so in diameters of the pelvis. It is a common place that a relatively wide pelvis and relatively short extremities are feminine secondary sexual characters[1]. The corresponding G.R.C.s seem to indicate that tall women show these sexual characteristics more clearly than do small women.



Average growth reductional coefficient (human ad. popul.)
..... males ——— females

The average G.R.C.s are less marked in Negroes than in white races. The difference is quite evident for each studied segment and is usually larger than two units; its maximum is found in the leg, its minimum in the average head diameter and the nasal height. An increase of general body size determines again the negative allometry of body parts, but this influence is much less pronounced in Negroes than among Europeans. The Negro is macroscelic and the distal segment is mainly responsible for the elongation of the lower extremity. The Negro further has one of the shortest noses ever measured in anthropology. Both racial features are more clearly manifested in tall people, since the leg is relatively least and the nose relatively most reduced. Table I shows the average G.R.C. for both sexes and in the main racial groups.

In infra-human primates, the same general allometric law has been tested and found to exist. Again increasing body size in a homogeneous adult population has a negative, i.e. decreasing influence on the relative dimensions of various parts. It can be demonstrated in about 98% of all cases. This reduction is more pronounced in the platyrrhine primates than in the catarrhines. Table II shows the average G.R.C. and compares them with the corresponding values in adult man. The gibbons have constantly greater, the chimpanzees smaller coefficients than man. A sexual difference, as far as our problem is concerned, is much more marked among monkeys and apes: the males show a much greater negative allometry than the females of the same group.

The connections between this negative allometry and age changes, hybridization and changes due to

[1] New evidence on this fact has been found in the present work, by comparing absolute dimensions among individuals of both sexes and of the same sitting height in a single population, thus eliminating the pseudo-sexual influence of general body size.

Table II.–Average growth reductional coefficients in primates (adults of both sexes)

Segment	Platyrrhinian	Gibbon	Man	Chimpanzee	Infra-human catarrh.
Total Upper extremity		– 5·93	– 4·55	– 3·09	– 4·55
Upper arm length . . .	– 6·24	– 6·12	– 3·98		
Forearm length	– 5·98	– 5·37	– 3·74		
Hand length	– 7·49	– 6·34	– 4·73	– 4·50	– 5·42
Total lower extremity .		– 5·51	– 5·22	– 2·40	– 3·95
Thigh length	– 6·24	– 6·00	– 5·17		
Leg length	– 6·22	– 5·16	– 4·31		
Foot length.	– 6·96	– 6·36	– 5·18	– 3·75	– 5·05
Upper face height . . .	– 9·14		– 4·19		– 2·10
Average segment . . .	– 6·89	– 5·84	– 4·56	– 3·43	– 4·21

migration have been studied for the dissertation in a preliminary way on a limited amount of data. In this abstract it can merely be mentioned that it was found that in most F_1-hybrid groups an increased sitting height was accompanied by reductions in the relative dimensions of the body parts investigated. The effects of migration, whenever consisting primarily in increased sitting heights, show clearly this law of negative allometry.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der Sitzhöhe auf die relative Grösse der Kopfdurchmesser, der Gesichtshöhe, Nasenhöhe, Länge der Gliedmassen und deren Teile sowie der transversalen Durchmesser des Rumpfes. Sie stützt sich auf Masse, die an etwa 68 000 Individuen (Menschen und Affen) gemessen wurden. Bei Zunahme der Sitzhöhe weisen die nach der Rumpfhöhe berechneten Indizes in 95–98 % der Fälle eine progressive Abnahme auf. Zwischen beiden extremen Klassen der nach Sitzhöhe geordneten Bevölkerungen beträgt diese Abnahme ungefähr 5 % des durchschnittlichen Indexes; sie wurde aber mehr im einzelnen, den verschiedenen Körperteilen und Primatenbevölkerungen nach sowie in Beziehung mit eventuellem Geschlechtseinfluss berechnet. Auch in den durch Alter, Verpflegungsverhältnisse, Wanderzüge und Kreuzung verursachten Änderungen der Sitzhöhe kommt die negative Allometrie zum Ausdruck.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Mesure des âges géologiques par les halos pléochroïques

Nous avons étudié la possibilité de déterminer l'âge géologique des roches cristallines à partir des halos pléochroïques en combinant la photométrie des halos à la mesure de l'activité α des inclusions[1].

Nous croyons utile de publier ici quelques résultats préliminaires. Les détails expérimentaux et la bibliographie complète seront publiés ailleurs; citons cependant l'intéressant travail de Hayase[2] sur le même sujet.

Les mesures ont été faites sur des lames minces classiques. Nous n'avons retenu que les halos dans la biotite formés par des inclusions de dimension supérieure à 50 μ, de façon à être dans les conditions d'émission α en couche épaisse. L'activité α des inclusions a été mesurée par la technique des émulsions photographiques nucléaires (émulsion Ilford C 2). L'absorption de la lumière par le halo a été mesurée sur la lame mince à l'aide d'un microphotomètre enregistreur. Nous avons éclairé la préparation par de la lumière blanche polarisée parallèlement à la direction d'absorption maximum de la biotite. La figure 1 représente un profil photométrique typique à travers un halo intense.

Pour exprimer l'intensité de coloration d'un halo, l'intégrale de la densité optique le long d'un profil[3], D, s'est avérée un paramètre intéressant. Elle est définie par:

$$D = -\int_0^r \log_{10} \frac{I_h}{\bar{I}_B}\, dx \quad \text{où}$$

x = distance perpendiculaire au bord de l'inclusion;

I_h = $I_h(x)$ = transmission en un point du halo;

$\bar{I}_B$ = transmission moyenne de la biotite non affectée par le halo;

r = rayon d'action du halo (distance x pour laquelle $I_h = \bar{I}_B$).

Soit N_α = l'activité spécifique mesurée de l'inclusion; elle est exprimée en nombre d'α émis par seconde et par cm² en couche épaisse.

t = le temps pendant lequel la biotite a été soumise à l'action du rayonnement α de l'inclusion (âge);

α = l'irradiation totale ou nombre total d'α par cm² émis par l'inclusion pendant le temps t;

α = $N_\alpha t$ pour des roches dont l'âge est petit devant la période de l'U. Sinon, il faut tenir compte de la décroissance de l'activité.

On sait que $D = f(\alpha)$ présente une zone croissante linéaire, une zone saturée et une zone décroissante d'inversion[1].

Nous avons admis, pour les échantillons choisis, les 2 hypothèses suivantes:

[1] J. Joly et E. Rutherford, Phil. Mag. *25*, 644 (1913).

[2] I. Hayase, Am. Miner., *39*, 761 (1954).

[3] D est proportionnel à l'épaisseur de la lame; nos lames avaient une épaisseur de 30 μ environ.

[1] H. Jedrzejowski, C. r. Acad. Sci. r. *186*, 135 (1928). – G. H. Henderson et S. Bateson, Proc. roy. Soc. *145*, 563 (1934).

1° La fonction f est la même pour toutes les biotites (même sensibilité aux α).

2° L'effet de coloration du halo obéit à la loi de réciprocité, soit

$$D = f(\alpha) = f(N_\alpha t)$$

quel que soit le temps nécessaire pour émettre le nombre d'α.

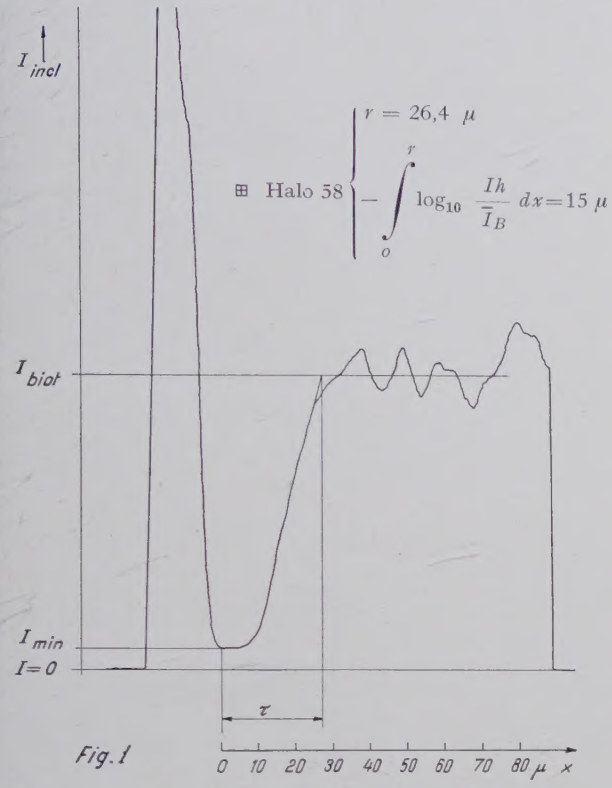


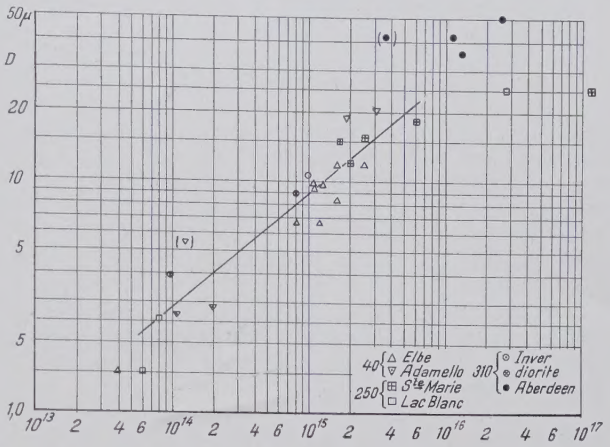
Figure 1.

Cette hypothèse doit être évidemment en défaut pour les roches fortement métamorphisées.

Nous avons également admis que D ne dépend pas d'une manière sensible du rapport des concentrations en Thorium et Uranium dans l'inclusion.

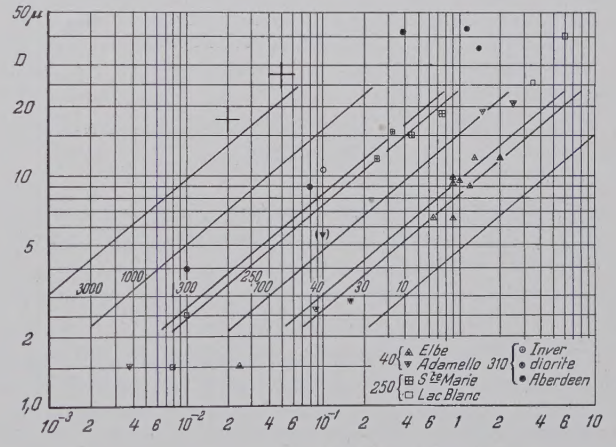
Roche	Age géologique	Age absolu (échelle B de Holmes)
Italie:		
Granite Monte Capanne (Elba)	Eocène supérieur (orogénèse alpine)	$40 \cdot 10^6$ ans
Granodiorite (Adamello)		$40 \cdot 10^6$ ans
Vosges:		
Granite Ste-Marie-aux-Mines	Carbonifère inférieur (orogénèse hercynienne)	$250 \cdot 10^6$ ans
Granite Lac Blanc		$250 \cdot 10^6$ ans
Ecosse:		
Granite Inver	Fin silurien, début dévonien (orogénèse calédonienne)	$310 \cdot 10^6$ ans
Diorite Inver		$310 \cdot 10^6$ ans
Granite Aberdeen		$310 \cdot 10^6$ ans

Nous avons choisi pour cette étude des roches granitiques d'âge géologique connu et n'ayant pas subi de métamorphisme important depuis leur formation. Elles sont énumérées au Tableau. Les âges absolus ont été attribués sur la base de l'échelle B de Holmes[1].



α = irradiation totale α/cm^2.
Figure 2.

La courbe 2 montre D en fonction du nombre total d'α. Entre $D = 2\ \mu$ et $D = 20\ \mu$ la variation est en première approximation linéaire en coordonnées bilogarithmiques. Pour $D < 2\ \mu$, le halo est trop faible pour être mesuré. Pour $D > 20\ \mu$ on est dans la zone saturée. Nous avons également rencontré des halos inversés pour $\alpha > 10^{18}$. Nous avons tracé la meilleure droite calculée par la méthode des moindres carrés, en attribuant le même poids à tous les points. Les points correspondant à des inclusions sans halo ont été placés sur la droite D=1,5 μ. Malgré une dispersion notable qui pourra être réduite en perfectionnant la technique, on n'observe pas de ségrégation suivant les trois groupes d'âges. Ceci montre que dans les limites d'erreurs, nos hypothèses sont vérifiées et que les âges attribués sont dans le bon rapport.



N_α = activité spécifique.
Figure 3.

La Figure 3 représente, dans le même système de coordonnées, les valeurs de D en fonction de N_α (N_α = 0,1 cm^2/s pour un zircon contenant environ 0,1 % U).

En vertu de l'hypothèse de réciprocité, on a

$$D = F\ (\log \alpha) = F\ (\log N_\alpha + \log t).$$

Les points de même âge doivent se placer sur les courbes (isochrones) obtenues par translation de la courbe générale F (log α) de la Figure 2. On a

[1] A. Holmes, Trans. Geol. Soc., Glasgow *32*, 117 (1947).

tracé un réseau d'isochrones correspondant à diverses valeurs de t de 10 à 3000 millions d'années. On y a tenu compte de la décroissance de l'activité en supposant un rapport unité des activités de l'U et du Th.

On voit que les points expérimentaux compris entre $D = 2\ \mu$ et $D = 20\ \mu$ se placent dans l'ordre relatif exact. La séparation entre les roches tertiaires et primaires est complète, mais les roches hercyniennes et calédoniennes ont des âges dont le rapport est trop voisin de 1 pour être séparés avec sécurité.

Il faut noter que le paramètre optique dépend dans une certaine mesure de la technique photométrique adoptée. Un étalonnage préliminaire est donc recommandé; les valeurs données ne sont qu'indicatives.

Les âges présentés ici dépendent indirectement de la méthode au plomb. Une détermination vraiment absolue par la méthode des halos impliquerait une calibration par irradiation artificielle.

La méthode de détermination de l'âge d'une roche éruptive par les halos, relativement simple et basée sur un phénomène très fréquent, nous semble présenter de l'intérêt pour le géologue. Il est trop tôt pour définir sa précision. Son domaine d'application s'étendra principalement aux roches jeunes (post-cambriennes), car sa précision dépend surtout du rapport des âges. De plus, pour les roches très anciennes, les densités optiques convenables ($D < 20\ \mu$) correspondent à des activités spécifiques trop faibles pour être mesurées sur une seule inclusion.

Ajoutons, pour terminer, que cette méthode, au même titre que d'autres basées sur des effets physiques de radiation: état métamict[1], thermoluminescence[2], pourrait donner des renseignements sur l'âge des roches métamorphiques ou, inversement, sur l'histoire thermique de roches d'âge connu.

Nous sommes redevables au professeur A. Bianchi et à Mme Hieke-Merlin de l'Université de Padoue et au Professeur P. Michot de l'Université de Liège des lames minces de l'Adamello et d'Ecosse ainsi que d'utiles discussions sur l'attribution des âges géologiques. – Nous remercions MM. A. Dewalheyns et L. Ockum pour la réalisation des circuits électroniques et de la partie mécanique du microphotomètre.

Sarah Deutsch, D. Hirschberg et E. Picciotto

Laboratoire de Physique Nucléaire, Faculté des Sciences Appliquées, Université Libre de Bruxelles, le 25 décembre 1954.

Summary

In this preliminary work, the possibility of dating crystalline rocks by pleochroic haloes has been studied.

Halo-microphotometry has been combined with measurement of the alpha-activity of the inclusions by the photographic method.

Standard thin sections of well dated granites have been used for calibration purposes. The reciprocity law is shown to be valid within the limit of error. The resolving power of this method depends essentially on the age ratio. Tertiary and primary rocks are easily separated.

[1] H. D. Holland et J. L. Kulp, Science *3*, 312 (1950). – P. Hurley et H. W. Fairbairn, Bull. Geol. Soc. Amer. *64*, 659 (1953).

[2] D. F. Morehead et F. Daniels, J. Phys. Chem. *56*, 548 (1952).

Kationengleichgewichte in biologischen Systemen

Metallionen und biologische Wirkung[1]

Am biologischen Geschehen sind insbesondere Vorgänge in wässerigen Systemen beteiligt, die neben organischen Verbindungen noch anorganische Ionen enthalten. Von diesen Ionen sind wieder, wie durch zahlreiche Untersuchungen bekannt geworden ist[2], die Ionen der sogenannten Spurenelemente Fe, Mn, Cu, Zn, Co und Mo von grosser Bedeutung, indem die Wirkung vieler Fermente an ihr Vorhandensein gebunden ist.

Nach der Säure-Basen-Theorie von Lewis sind nun solche Metallionen ebenso wie H^+ als «Säure»-Partikel aufzufassen. Es ist deshalb von Interesse, das relative Verhalten aller dieser Ionen gegenüber organischen Komplexbildnern quantitativ zu charakterisieren.

Mit R wollen wir eine organische Verbindung bezeichnen, die eine oder mehrere basische Haftstellen besitzt. R kann dabei geladen oder ungeladen sein. Um die Besetzung dieser Haftstellen konkurrieren nun Metallionen $M_1^{2+}\ldots M_n^{2+}$ und H^+. Über die Stabilitäten der entsprechenden Metallkomplexe bzw. des Assoziates mit H^+ geben die Stabilitätskonstanten k und k_{H^+} in den Gleichgewichten (1) und (2) Auskunft.

$$\frac{|\,RM_n^{2+}\,|}{|\,M_n^{2+}\,|\;|\,R\,|} = k \quad (1) \qquad \frac{|\,RH^+\,|}{|\,H^+\,|\;|\,R\,|} = k_H + = \frac{1}{k_s} \quad (2)$$

k_s bedeutet dabei in Gleichung (2) die Aziditätskonstante der Verbindung R.

Um nun die Stellung des Wasserstoff-Ions innerhalb der Beständigkeitsreihe der Metallionen $M_1^{2+}\ldots M_n^{2+}$ sichtbar zu machen, benützen wir als Masszahl der Komplexstabilität den Quotienten k/k_{H^+} und bezeichnen diese Konstante mit k^*[3]. Die Affinität des Wasserstoff-Ions zu R wird damit in der Reihe der log k^*-Werte – wie in der Spannungsreihe der Metalle – zu einem natürlichen Nullpunkt.

Bei der Betrachtung der Komplexstabilitäten bekannter Komplexbildner fällt nun auf, dass, während die von H. Irving und R. J. P. Williams angegebene Reihenfolge der Metallionen[4], nach den bisherigen Untersuchungen, unabhängig von der Struktur von R konstant bleibt, die Stellung des H^+ in der Reihe veränderlich ist und damit für R charakteristisch wird.

In der Folge sind log k^*-Werte für 4 verschiedene Komplexbildner angegeben[5] (Fig).

Oxin ist eine der wenigen Verbindungen, die positive log k^*-Werte aufweisen, das heisst bei gleichen Konzentrationen von Cu^{2+} und H^+ vermag Cu^{2+} das Proton zu verdrängen. Für Aminosäuren aber, und insbesondere für einfache Peptide, die in erster Näherung als Proteinmodelle angesehen werden können, sind die log k^*-Werte durchweg negativ.

[1] 32. Mitt.; 31. Mitt. siehe H. Erlenmeyer und H. Rey-Bellet, Helv. *38* (1955).

[2] O. Warburg, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten* (Dr. W. Sänger, Berlin 1946). – E. L. Smith, *Aspects of the Specificity and mode of action of some Peptidases. Enzymes and Enzyme Systems* (Harvard University Press, Cambridge 1951), p. 49. – I. M. Klotz, *Thermodynamic and Molecular Properties of some Metal Protein Complexes, A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action* (The John Hopkins Press, Baltimore 1954), p. 257.

[3] S. Fallab, Exper. *10*, 190 (1954).

[4] H. Irving und R. J. P. Williams, J. chem. Soc. *1953*, 3192.

[5] A. E. Martell und M. Calvin, *Chemistry of the Metal Chelate Compounds* (Prentice Hall Ing., New York 1952), p. 527.

Die Anwendung dieser modellmässigen Betrachtung erlaubt nun interessante Feststellungen hinsichtlich des Metallionen-Haushalts in Organismen.

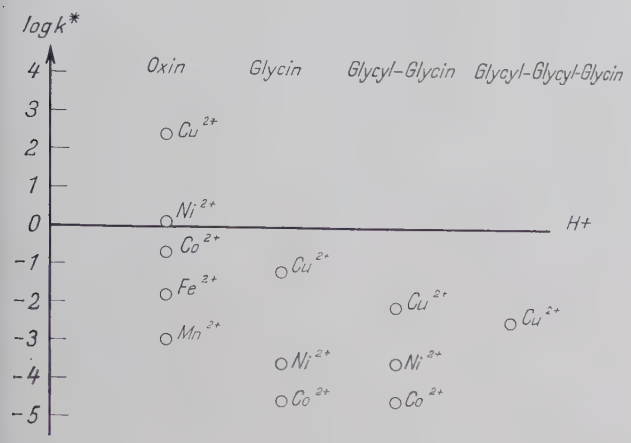


Abb. 1.

Der Cu-Gehalt im Plasma des Menschen wird zu $100 \pm 10 \cdot 10^{-6}$ g/100 cm³ angegeben[1]. Das entspricht einer Konzentration von $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Bei einem Gesamt-Proteingehalt von 6% und unter der Annahme eines mittleren Molekulargewichts von 90000[4] ergibt sich eine Proteinkonzentration von $6{,}7 \cdot 10^{-2}$. Da, wie KOECHLIN[2] gezeigt hat, ein Proteinmolekül zwei Metallionen bindet, so wird die Konzentration der zur Metallkomplexbindung befähigten Molekülreste R rund $1{,}3 \cdot 10^{-3}$. Unter der Voraussetzung eines mittleren log-k^*-Wertes von $-3{,}0$ findet man dann beim pH 7 für das Verhältnis gebundenes Metall zu freiem Metall $|\,R\mathrm{Me}^{2+}\,|/|\,\mathrm{Me}^{2+}\,| = 13$. Das bedeutet, dass die im Plasma vorhandenen Cu^{2+} zur Hauptsache an das Protein gebunden sind.

Die Konzentration der im Plasma frei vorkommenden Cu^{2+} wäre demnach etwa 10^{-6}. Es ist anzunehmen, dass dies einem Gleichgewichtszustand entspricht, der durch den ständigen Zufluss neuer Metallionen von aussen aufrechterhalten wird.

Die Abweichungen des Kupferspiegels im kranken Organismus gegenüber der Norm können erhebliche Werte erreichen. So kann im Falle einer Leukämie und einiger Infektionskrankheiten die Cu-Menge im Plasma verdoppelt werden[3]. Fasst man diese Erhöhung des Kupferspiegels als eine Erhöhung der Kupferkapazität des Systems bei gleichbleibender Cu-Zufuhr von aussen – das heisst bei gleichbleibender Konzentration an freien Cu^{2+} – auf, so kann dies durch verschiedene Faktoren bedingt sein:

1. Durch eine Erhöhung des pH um 0,3 Einheiten.
2. Durch eine Änderung im mittleren k^* des Systems um einen Faktor 2 durch Auftreten stärkerer Komplexbildner.
3. Durch eine Verkleinerung des mittleren Molekulargewichts der Cu-bindenden Proteine.

S. FALLAB und H. ERLENMEYER

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel, den 8. Februar 1955.

Summary

The affinity of H^+ and various metal-ions towards complexing agents of biological importance is characterised by the formation constant k^*. The binding state of Cu^{2+} in human plasma is discussed and the amount of free Cu^{2+} is estimated to about 10^{-6} moles per liter.

The Steric Course of Hydrogenation of Δ^4 and Δ^5 Steroids[1]

In order to rationalize and predict the steric course of catalytic hydrogenation occuring close to room temperature and atmospheric pressure there has developed the notion of a *simultaneous cis attack* on the least hindered side of the unsaturated substrate by hydrogen adsorbed on the catalyst surface[2]. In the text below the current concepts of axial[3] and equatorial analysis[4] have been applied to the hydrogenation of carbon to carbon double bonds.

The favored steric course of reduction passes through the most stable intermediate complex[5]. This complex I, a quasi six-membered ring (axial bonds are solid lines, equatorial bonds are broken lines) is held together by partial bonds[6] between two active centres on the catalyst[7], two hydrogen atoms, and the two originally unsaturated carbon atoms. Entering hydrogen, which is axial, is sterically hindered by *meta cis axial* substituents of the substrate, while hindrance to new equatorial hydrogen is neglected[4]. This hindrance to the new hydrogens is termed the *primary steric factor*. Another steric factor called the *secondary steric factor* is the interactions between rings and substituents as the molecule assumes its reduced form. This latter steric factor is usually but not necessarily of minor importance.

Catalytic reduction of Δ^4 steroids has been considered usually to give an excess of *A/B cis* compounds[8], while reduction of Δ^5 steroids invariably yielded a preponderance of *A/B trans* products[9]. Thus hydrogenation of cholestene-4[10] in a neutral medium gave principally coprostane (*A/B cis*), while in a similar reduction of cholestene-5[11], cholestane (*A/B trans*) was the main product.

Structures II and III represent the two possible complexes for the reduction of Δ^4 steroids. BARTON[4] deduced the conformations for the *A/B cis* and *A/B trans* steroids with a maximum number of rings in the chair form. In the *A/B trans* series only one conformation is possible as the *trans* substituents at C.5 and C.10

[1] G. E. CARTWRIGHT, *Copper Metabolism in Human Subjects* (The John Hopkins Press, Baltimore 1950), p. 274.

[2] B. E. KOECHLIN, J. Amer. Soc. *74*, 2649 (1952).

[3] G. E. CARTWRIGHT, *Copper Metabolism in Human Subjects* (The John Hopkins Press, Baltimore 1950), p. 274.

[1] Based in part on a portion of the Ph. D. Thesis of the author, University of Wisconsin, 1951.

[2] R. P. LINSTEAD, W. E. DOERING, S. B. DAVIS, P. LEVINE, and R. R. WHETSTONE, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1985 (1942).

[3] D. H. R. BARTON, O. HASSEL, K. S. PITZER, and V. PRELOG, Nature *172*, 1096 (1953).

[4] D. H. R. BARTON, J. Chem. Soc. *1953*, 1027.

[5] A. C. GLASSTONE, F. H. LAIDLER, and H. E. EYRING, *Theory of Rate Processes*, McGraw-Hill Book Co., New-York, N. Y. (1941).

[6] F. DANIELS, Ind. Eng. Chem. *35*, 504, (1943).

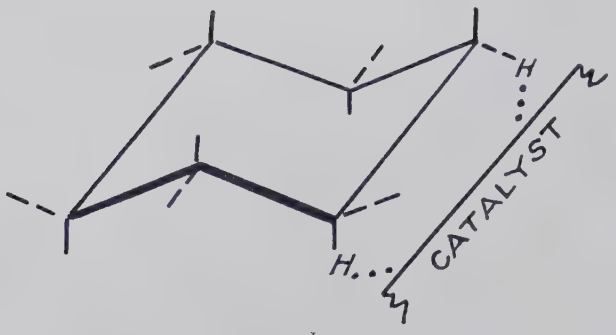
[7] H. ADKINS in H. GILMAN, Editor-in-Chief, *Organic Chemistry An Advanced Treatise*, 2nd ed. (John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1943), p. 793.

[8] The subsequent text considers the occasional formation of A/B *trans* products from Δ^4 steroids.

[9] F. FIESER and M. FIESER, *Natural Products Related to Phenanthrene*, 3rd ed., Reinhold Publishing Corporation, New York, N. Y., 1949, pp. 442, 635, 668. – H. H. INHOFFEN, G. STOECK, G. KOLLING, and V. STOECK, Ann. *568*, 52 (1950).

[10] A. WINDAUS, Ber. *52*, 170 (1919), reference 9, p. 121.

[11] J. MAUTHNER, Monatsh. *30*, 635 (1909), reference 9, p. 121.



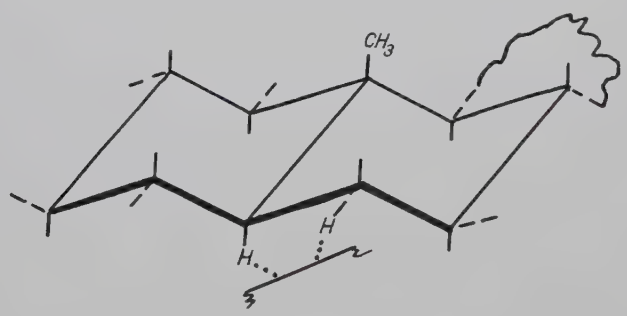
I

are each axial to rings *A* and *B*. A decision must be made between the two possible all chair conformations for the *A/B* cis steroids. In one conformation the angular methyl group at C.10 is simultaneously axial to ring *B* and equatorial to ring *A*, while the hydrogen at C.5 is axial to ring *A* and equatorial to ring *B*. In the other possible conformation the axial and equatorial relationships are reversed at C.5 and C.10. Since *B/C* ring fusion is *trans* the hydrogen at C.9 is axial to ring *B* and the *anti* angular methyl group at C.10 must be axial to ring *B*. Thus the choice for the *A/B cis* steroids is the former of the two conformations. In II, as the new hydrogen at C.4 is equatorial, the *primary steric factor* is only due to the new hydrogen at C.5 which is axial to rings *A* and *B*. The *meta cis axial* substituents causing the hindrance are axial hydrogens at C.1, C.3, C.7 and C.9. Similarly, the *primary steric factor* in III only includes the axial hydrogens at C.1 and C.3. From this analysis III is the most stable intermediate, in agreement with the *A/B cis* product[1].

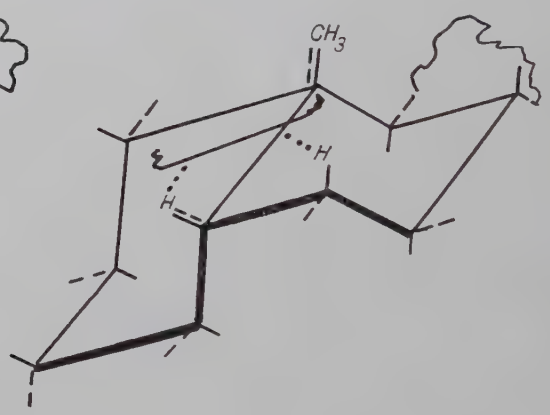
The two possible complexes for the reduction of cholestene-5 are shown by IV and V. In IV the *primary steric factor* is determined by the axial hydrogens at C.1, C.3, C.7 and C.9, The *primary steric factor* in V is determined by the axial hydrogens at C.1, C.3 and C.8 and the angular methyl group at C.10. Thus IV is the most stable intermediate in agreement with the *A/B trans* product[2].

Every analysis thus far has included axial hydrogen at C.3. If a 3-keto group does not invalidate the analysis for the remainder of the molecule the above prediction should hold for 3-keto steroids being reduced by a 1,2 addition mechanism. Such continuity is illustrated by the reduction of cholestene-4-one-3[3] to coprostanone (*A/B cis*) and cholestene-5-one-3 to a mixture of the C.3 epimers of cholestanol-3 (*A/B trans*)[4]. This datum is complicated as the Δ^5 double bond migrates easily to a position in conjugation with the 3-keto group[5]. In agreement with the theory is the reduction of cholesterol to 3-β-cholestanol (*A/B trans*)[6], the stereospecificity being aided by the 3-β-hydroxyl which is *meta, cis* and *axial* to a β incoming hydrogen at C.5.

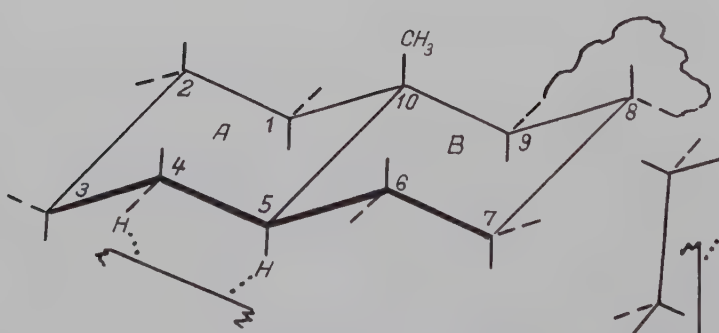
[1] A. Windaus, Ber. dtsch. chem. Ges. *52*, 170 (1919), ref. 9, p. 121.
[2] J. Mauthner, Monatsh. *30*, 635 (1909), ref. 9, p. 121.
[3] H. Grasshof, Z. Physiol. Chem. *223*, 249 (1934), ref. 9, p. 98.
[4] L. Ruzicka and M. W. Goldberg, Helv. chim. Acta *19*, 1407 (1936), ref. 9, p. 261.
[5] C. W. Shoppee and G. H. Summers, J. Chem. Soc. *1950*, 687.
[6] R. Willstatter and E. W. Mayer, Ber. dtsch. Chem. Ges. *41*, 2199 (1908), ref. 9, p. 97.



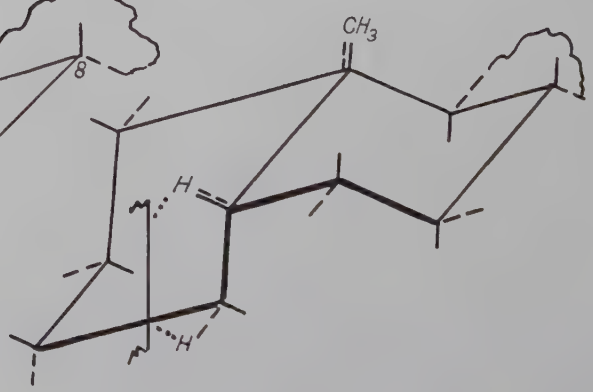
II



III



IV



V

The *primary steric factor* is more prominent in the Δ^5 series because only in this series is the role of C.10 angular methyl group significant. The *secondary steric factor* for both Δ^4 and Δ^5 steroids may be approximated since in the decalins *trans* fusion is more stable than *cis* fusion[1]. Other factors, such as bulky substituents, electronically polarizable groups and the acidity of the medium may either assist or oppose the *primary steric factor*. As the above considerations have not involved charged entities the mechanism may be quite different when the proton concentration of the medium is increased. BARTON's remarks on the influence of acidity on the steric course and rate of hydrogenation of ketones are in keeping with this concept[2].

The summation of both types of steric factors indicates that the course of reduction determined by the *primary steric factor* would be most easily reversed in the Δ^4 steroids. Indeed it has been noted that while there are examples when the reduction of Δ^4 compounds leads primarily to *A/B trans* products, there has only recently accumulated specialized instances of Δ^5 steroids yielding *A/B cis* compounds in preponderance[3]. Hence under acidic conditions, due to the intervention of a different mechanism poorer yields of *A/B cis* and *A/B trans* compounds may be obtained from Δ^4 and Δ^5 steroids respectively. In agreement is: the reduction under acidic condition of cholestene-4 to cholestane (*A/B trans*)[4]; the improved yield of stigmast-22-en-3-one (*A/B cis*) from the Δ^4 compound stigmast-4, 22-dien-3-one under alkaline conditions[5]. The hydrogenation of several Δ^5 steroids[3] (3-α-methoxycholest-5-ene, 3-α-acetoxycholest-5-ene, 3-α-hydroxycholest-5-ene) gave principally *A/B cis* products in an acidic medium. Because in these examples the 3α substituents would be *meta, cis* and *axial* to an α incoming hydrogen at C.5 a decision cannot be reached as to whether the results were due to the acidity of the medium or the hindrance of the 3 α substituents which would compete with the angular methyl group at C.10 when estimating the *primary steric factor*. It is of interest, as mentioned by LEWIS and SHOPPEE, that MARKER[6] reported a quantitative yield of the *A/B trans* product from 3-α-hydroxycholest-5-ene for hydrogenation in the absence of additional acid.

The author is indebted to Professor WILLIAM S. JOHNSON and Dr. LELAND J. CHINN for stimulating discussion concerning this topic.

H. I. HADLER

Division of Oncology, The Chicago Medical School, Chicago 8, Ill., October 1, 1954.

Zusammenfassung

Bei der katalytischen Hydrierung von Steroiden mit Doppelbindung in 4-Stellung entstehen überwiegend A/B-cis-Verbindungen, während Doppelbindung in 5 vor allem A/B-trans liefert. Dieser Unterschied wird mit Hilfe der Konstellationsanalyse erklärt: die als Zwischenformen angenommenen Komplexe aus Substrat, Wasserstoff und Katalysator weisen unterschiedliche sterische Hinderung auf.

[1] R. B. TURNER, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2119 (1952).
[2] D. H. R. BARTON, J. Chem. Soc. *1953*, 1027.
[3] J. R. LEWIS and C. W. SHOPPEE, Chem. and. Ind. *1953*, 897.
[4] A. WINDAUS, Ber. dtsch. chem. Ges. *52*, 170 (1919), ref. 9, p. 121.
[5] G. SLOMP, Jr., Y. F. SHEALY, J. L. JOHNSON, R. A. DONIA, and B. A. JOHNSON, 124th meeting, Amer. Chem. Soc., Chicago, III., Sept. 6–11, 1953.
[6] R. E. MARKER, T. S. OAKWOOD, and H. M. CROOKS, J. Amer. Chem. Soc. *58*, 481 (1936).

Die Wirkung der Nukleinsäuren auf die Bakterienphagozytose der Leukozyten

In den letzten Jahren durchgeführte Untersuchungen über Funktion und physiologische Eigenschaften der Nukleoproteide zeigten immer deutlicher, dass diese Eiweisse in enger Beziehung stehen zu Fortpflanzung, Vererbung und Wachstum[1]. Desoxyribonukleinsäure ist hauptsächlich im Zellkern, Ribonukleinsäure vorwiegend im Zytoplasma zu finden. MANDEL, MÉTAIS und CUNY[2] wiesen nach, dass auch die Leukozyten Nukleinsäuren enthalten. Zwischen den einzelnen Tierarten besteht in dieser Hinsicht kein signifikanter Unterschied. Bei örtlichen Entzündungsprozessen werden infolge der Ansammlung und des Zerfalls der Leukozyten die Abbauprodukte der Nukleoproteide, vor allem die Nukleinsäuren, lokal vermehrt. Daraus ergab sich für uns die Frage nach der Wirkung der Nukleinsäuren auf die Bakterienphagozytose der Leukozyten. Zu ihrer Abklärung haben wir in-vitro-Versuche an überlebenden Leukozyten durchgeführt.

In unseren Experimenten verwendeten wir Rattenleukozyten, die nach steriler Bouillonimpfung aus der Bauchhöhle der Tiere gewonnen wurden. Den Phagozytosegrad der Zellen bestimmten wir nach der Methode von WRIGHT. Das Phagozytosesystem bestand aus 0,5 cm^3 Leukozytensuspension (1 mm^3 : 10000 Leukozyten), 0,1 cm^3 Rattenserum, 0,1 cm^3 Bakteriensuspension (1 mm^3 : 10000000 *Staphylococcus pyogenes aureus*). Dazu wurde 0,1 cm^3 ribonukleinsaures bzw. desoxyribonukleinsaures Na verschiedener Konzentration oder, in den Kontrollversuchen, physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. Das pH des Systems lag zwischen 7,0 und 7,2. Das Gemisch wurde 60 min im Thermostaten bei 37°C gehalten und alle 15 min durchgeschüttelt. Danach wurden Ausstrichpräparate der sedimentierten Leukozyten nach *May-Grünwald-Giemsa* gefärbt und für jeden Versuch ausgezählt, wie viele Kokken von je 400 Leukozyten phagozytiert worden waren. Statistische Auswertungen ergaben eine Streuung $\sigma < \pm 9\%$. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden die verschiedenen Proben aus einem Versuch immer gleichzeitig bearbeitet und damit Unterschiede von Faktoren, wie Zeit, Temperatur, Zellenzahl usw., ausgeschaltet.

Die Resultate unserer Versuche sind in Tabelle I und II dargestellt, wobei die absolute Zahl der von 400 Leukozyten aufgenommenen Staphylokokken und, in Klammer, die Abweichung vom Kontrollwert angegeben werden. Nach unseren Befunden hat sowohl das ribonukleinsaure Na wie das desoxyribonukleinsaure Na eine phagozytosefördernde Wirkung. Ein schwacher Effekt lässt sich schon in verhältnismässig niedriger Konzentration nachweisen. Ribonukleinsäure ergibt in Verdünnung von 1:100000 eine Zunahme von 10 bis 20%, Mittelwert + 13%, in Verdünnung von 1:10000 eine solche von 20 bis 37%, Mittelwert + 29%. Ähnlich waren die Ergebnisse mit desoxyribonukleinsaurem Na. Verdünnung von 1:100000 bewirkte eine Zunahme der Phagozytose um 14–18%, Mittelwert + 14%, Verdünnung von 1:10000 zeigte einen verstärkten Effekt von 20 bis 42%, Mittelwert + 33%. Wie aus den Tabellen hervorgeht, erfolgten bei stärkeren Verdünnungen keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert.

Auf Grund dieser Befunde können wir feststellen, dass bei entzündlichen Prozessen mit der phagozytosefördern-

[1] H. v. EULER, Dtsch. Med. Wschr. *73*, 265 (1948).
[2] P. MANDEL, P. MÉTAIS und S. CUNY, C. r. Soc. Biol. (Paris) *131*, 1172 (1950).

Tabelle I

Versuche	Zahl der phagozytierten Straphylokokken					Bemerkung
	Kontrolle	Desoxyribonukleinsaures Na				
		1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000	
1.	318	444 (+40)	361 (+14)	332 (+3)	312 (−2)	Ratten-Leukozyten
2.	289	386 (+34)	342 (+18)	282 (−2)	295 (+2)	Ratten-Leukozyten
3.	265	335 (+27)	300 (+13)	270 (+2)	273 (+3)	Ratten-Leukozyten
4.	222	293 (+32)	246 (+11)	220 (−1)	216 (−3)	Ratten-Leukozyten
5.	301	402 (+33)	347 (+15)	306 (+2)	309 (+3)	Ratten-Leukozyten
6.	240	288 (+20)	268 (+12)	242 (+1)	252 (+5)	Ratten-Leukozyten
7.	314	445 (+42)	360 (+15)	320 (+2)	320 (+2)	Ratten-Leukozyten
8.	381	498 (+42)	432 (+13)	389 (+3)	374 (−2)	Ratten-Leukozyten
9.	262	342 (+31)	299 (+14)	262 (±0)	234 (−7)	Ratten-Leukozyten
10.	289	360 (+29)	329 (+14)	280 (−3)	272 (−6)	Ratten-Leukozyten

Tabelle II

Versuche	Zahl der phagozytierten Staphylokokken					Bemerkung
	Kontrolle	Ribonukleinsaures Na				
		1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000	
1.	233	302 (+30)	256 (+10)	225 (−2)	234 (±0)	Ratten-Leukozyten
2.	315	372 (+18)	353 (+12)	292 (−7)	307 (−2)	Ratten-Leukozyten
3.	289	364 (+26)	342 (+18)	297 (+2)	283 (−2)	Ratten-Leukozyten
4.	301	380 (+26)	345 (+14)	304 (+1)	295 (−2)	Ratten-Leukozyten
5.	272	379 (+28)	304 (+11)	270 (−1)	274 (+1)	Ratten-Leukozyten
6.	262	348 (+33)	306 (+17)	269 (+2)	258 (−2)	Ratten-Leukozyten
7.	291	392 (+35)	331 (+14)	296 (+2)	285 (−2)	Ratten-Leukozyten
8.	323	443 (+37)	358 (+11)	336 (+4)	330 (+2)	Ratten-Leukozyten
9.	273	374 (+37)	328 (+20)	286 (+5)	281 (+3)	Ratten-Leukozyten
10.	394	472 (+20)	432 (+10)	390 (−1)	392 (−1)	Ratten-Leukozyten

den Wirkung der Nukleinsäuren zu rechnen ist, die beim Zerfall der Leukozyten frei werden. Wie wir schon in früheren Untersuchungen gezeigt haben, beruht die phagozytosefördernde Wirkung des Exsudates auf einem Zusammenwirken mehrererFaktoren (Histamin[1], «Leukotaxin»[2], LPF-Faktor[3], Hyaluronidase[4] usw.). Eine Beteiligung mehrerer biogener Stoffe wird auch von Lipsic[5] angenommen.

G. Ludány und Gy. Vajda

Pathophysiologisches Institut der Universität Budapest, den 20. Dezember 1954.

Summary

Sodium ribonucleinate and sodium desoxyribonucleinate increases *in vitro* the phagocytosis of surviving rat's leucocytes. The average figure for the effect is greater than the limits of error, even in dilutions of 1:100,000. In dilutions of 1:10,000, the action is more striking, the results being 33% and 29% respectively above the control value.

[1] G. Ludány und Gy. Vajda, Arch. int. Pharmacodyn. *85*, 484 (1951); *88*, 442 (1952).

[2] G. Ludány und Gy. Vajda, Tag. Ung. Physiol. Ges. 1951, Arch. int. Pharmacodyn. *88*, 442 (1952).

[3] G. Ludany, Gy. Vajda und E. Tóth, Tag. Ung. Physiol. Ges. 1952, Arch. int. Pharmacodyn. *100*, 339 (1955).

[4] G. Ludány, T. Orbán und Gy. Vajda, Arch. int. Pharmacodyn. *88*, 496 (1952).

[5] R. U. Lipsic, Archiv Pathologii (SSSR.) Nr. 3, 29 (1951).

Der Atmungsquotient der Tabakblätter

Eichenberger[1] hat nachgewiesen, dass die Blätter der schweizerischen Tabaksorten Mt. Calme brun während des Tages einen Atmungsquotienten ($RQ = CO_2/O_2$) von 1,15 bis 1,35 aufweisen. Da die Tabakblätter reich an Apfelsäure, Oxalsäure und Zitronensäure sind[2], lag die Vermutung nahe, dass der Tabak wie die Sukkulenten am Tage organische Säuren veratmet, die nachts wieder regeneriert werden[3], wobei der Apfelsäurespiegel am stärksten in Mitleidenschaft gezogen wird[4]. Bei den Sukkulenten ist somit der RQ am Tage grösser, nachts dagegen kleiner als eins.

Wir haben daher eine umfassende Studie über den RQ der Tabakpflanze durchgeführt[5], um festzustellen, ob sich die Atmung wie bei den Sukkulenten verhalte. Es zeigte sich, dass der RQ sehr stark von der verwendeten Sorte abhängt; er liegt jedoch immer einwandfrei höher als eins. Vergleichbare Blätter von gleichzeitig aufgezogenen Pflanzen lieferten folgende Werte (S. 179):

Mit der Sorte Mt.Calme jaune wurden Versuche über die Tagesperiodizität des RQ durchgeführt. Es ergaben

[1] E. Eichenberger, Diss. ETH., Zürich 1952; Ber. Schweiz. Bot. Ges. *62*, 123 (1952).

[2] A. I. Smirnow, *Biochemie des Tabaks* (Junk, Den Haag, 1940). – H. B. Vickery, G.W. Pucher, Ch. S. Leavenworth und A. J. Wakeman, Connecticut Agr. Exp. Sta. Bull. *374* (1935); *399* (1937).

[3] K.V. Thimann und W. D. Bonner, Ann. Rev. Plant. Physiol. *1*, 75 (1950).

[4] G. W. Pucher, Ch. S. Leavenworth, W. D. Ginter und H. B. Vickery, Plant. Physiol. *22*, 360 (1947).

[5] P. Waltz, Diplomarbeit ETH., Zürich 1954 (unveröffentlicht).

Sorte	RQ	Nikotingehalt[1]
Mt. Calme jaune	1,06	0,5–2,0 %
White Burley	1,08	1,2–4 %
Mt. Calme brun	1,15	1 –4,5 %
Paesana.	1,26	2,5–5 %
Nicotiana rustica	1,37	bis 11 %

sich Werte von 1,06 bis 1,08 während der Nacht und ein Maximum von 1,15 bis 1,25 zur Mittagsstunde. Nie konnte ein Absinken des RQ unter eins festgestellt werden.

Hierauf wurde untersucht, ob die gefundenen überwertigen Atmungsquotienten in jungen Blättern, im Stengel oder in den Wurzeln kompensiert werden; es wurden jedoch stets RQ-Werte grösser als eins erhalten. Nur die keimenden Samen zeigten, solange sie ihr Fett veratmeten, tiefe RQ-Werte (anfänglich zum Beispiel 0,7); aber schon nach 72 h Keimzeit begann bei den gewählten Kulturbedingungen der RQ zu steigen, über schritt nach 7 Tagen eins und blieb nachher bei den Setzlingen stets zwischen 1,06 und 1,2.

Bei der Sorte Paesana wurden in den hochinserierten (jungen) Blättern RQ-Werte bis 1,7 gefunden, als Mittel aller Blätter 1,38, im Stengel 1,42 und in den Wurzeln 1,07. Nirgends konnten Atmungsquotienten von eins oder unter eins festgestellt werden. Nur nach vielstündiger Belassung der Blattschnitzel in der Warburgapparatur konnte nach völliger Veratmung des vorhandenen Säurevorrates schliesslich der Wert eins registriert werden.

Da der Tabak eine Stärkepflanze ist (im Laufe eines Tages können sich bis 2 g Stärke je Quadratmeter Blattfläche anhäufen[2]), sind als Atmungssubstrat in erster Linie Kohlehydrate mit dem RQ = 1 zu erwarten. Falls die überschwelligen RQ-Werte > 1 von sauerstoffreichen Verbindungen herstammen, die aus dem Tricarbonsäure-Zyklus abgezweigt worden sind (zum Beispiel Apfelsäure), so müssten sich während der Anhäufung dieser Säure unterschwellige RQ-Werte < 1 ergeben.

Das gleiche ist der Fall, wenn die Blattsäuren durch Bindung von Luftkohlensäure entstehen, wie dies für die Apfel-, Zitronen- und Isozitronensäure der Sukkulentenblätter durch Verabreichung von $C^{14}O_2$ nachgewiesen worden ist[3]. In diesem Falle muss während der Veratmung der Säuren der RQ > 1, bei der Regenerierung der Säuren dagegen < 1 ausfallen.

Da wir beim Tabak keine Werte < 1 finden konnten, muss es uns entweder trotz aller Bemühungen nicht gelungen sein, die Regenerierungsphase der Blattsäuren zu erfassen, oder aber diese Säuren dürfen nicht aus dem Kohlehydrat-Stoffwechsel stammen, sondern sie müssen *primäre Assimilationsprodukte* vorstellen. Oder, da bei der Transaminierung von Asparaginsäure Oxalessigsäure (RQ = 1,6) anfällt, von der sich leicht Apfelsäure (RQ = 1,33) und Oxalsäure (RQ = 4) ableiten lassen, muss ferner für deren Entstehung ein Zusammenhang mit dem Stickstoff-Stoffwechsel erwogen werden, denn die Aminosäuren sind als primäre Assimilationsprodukte bei der Photosynthese nachgewiesen worden[4]. Für eine solche Beziehung zum Aminosäure-Stoffwechsel spricht die auffällige Korrelation der RQ-Werte in obiger Tabelle mit dem Nikotingehalt der untersuchten Tabaksorten.

A. Frey-Wyssling und P. Waltz

Institut für Allgemeine Botanik der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, den 7. Februar 1955.

Summary

The respiration quotient (RQ) of the tobacco leaves is always higher than one. In contrast to that of the leaves of succulent plants it does not drop below unity during the night. From this it is concluded that the organic acids (malic, oxalic and citric acids), which serve as respiration substrate, cannot be related to the carbohydrate metabolism (tricarbon acid cycle). They must rather be considered as primary assimilation products or as related to the nitrogen metabolism (transamination of the primary assimilation product aspartic acid).

[1] H. Huter, Rapp. trim. Cent. Rech. Soc. achat Tabac indigène. Mont Calme Lausanne, Juin 1953 (unveröffentlicht).

[2] A. I. Smirnow, *Biochemie des Tabaks* (Junk, Den Haag, 1940).

[3] K. V. Thimann und W. D. Bonner, Ann. Rev. Plant. Physiol. *1*, 75 (1950). – J. Thurlow und J. Bonner, Arch. Biochem. *19*, 509 (1948).

[4] M. Calvin, J. chem. Education *26*, 639 (1949).

The Carotenoid Pigments of the Cedar Apple Rust Fungus

A considerable number of species of fungi, especially the rusts, are known to contain carotenoid pigments[1]. The pigments of the cedar apple rust, *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw., which has its telial stage upon red cedar, *Juniperus virginiana* L., have been examined by Smits and Peterson[2]. A petroleum ether extract of the pigments from telial galls, when chromatographed on a column consisting of a mixture of equal parts of magnesia and Hyflo Super-Cel, showed two colored zones, which were identified by means of their absorption maxima as β-carotene and γ-carotene. These two pigments were shown to be present in the telia in the proportion of 36% β-carotene to 64% γ-carotene[2].

Studies of the carotene content of pycnial lesions of this rust upon leaves of crabapple, *Malus ioensis* Britt., have also been made by Smits and Mitchell[3]. By similar methods, the carotene content of infected leaves was determined as 83·2 mg/100 g dry weight, of which 34·5% was γ-carotene. The carotene content of healthy leaves was 36·2 mg/100 g, and consisted entirely of β-carotene[3]. From these figures, it may be calculated that the difference in carotene content between healthy and rust-infected leaves is 47·0 mg/100 g, and that 61·1% of the increased carotene is γ-carotene, while 38·9% of the increase is represented by the β-isomer.

It is the purpose of the present note to report the nature of the carotenoid pigments present in the aecial stage of this fungus. Aecia on fruits of flowering crabapple, *Pyrus pulcherrima* Aschers. and Graebn., were gathered in the Sarah P. Duke Gardens, Duke University, Durham, N. C., in June 1954. The peridia and aeciospores were collected by scraping with a razor blade and allowing the scrapings to fall into petroleum ether. Thus it was possible to obtain in solution the pigments from aecia of the rust without admixture of host tissue.

The petroleum ether solution was then examined with a Model DU Beckman spectrophotometer. Absorption

[1] P. Karrer and E. Jucker, *Carotenoids* (Elsevier Publ. Co., N. Y., 1950), 384 pp.

[2] B. L. Smits and W. J. Peterson, Science *96*, 210 (1942).

[3] B. L. Smits and H. L. Mitchell, Science *113*, 296 (1951).

maxima were found at 462 and 490 mμ. Absorption maxima of the aecial pigments in benzene were found at 475 and 510 mμ; in hexane, at 462 and 495 mμ; in carbon disulphide, at 500 and 530 mμ.

An aliquot of the petroleum ether extract was chromatographed on a column consisting of a mixture of equal parts of magnesia and Hyflo Super-Cel. The column was developed with petroleum ether and two zones appeared. These were eluted separately with petroleum ether containing a small quantity of methanol. The upper zone, pinkish orange in color, showed absorption maxima at 442, 465 and 492 mμ. With carbon disulphide as the solvent, maxima were found at 463, 497 and 535 mμ. By comparison with values reported in the literature[1], the pigment was identified as γ-carotene. The lower zone, orange in color, exhibited absorption maxima in petroleum ether solution at 425, 452 and 480 mμ. In carbon disulphide, the absorption maxima were shifted to 455, 485 and 520 mμ. These values agree closely with accepted values for β-carotene[1].

To determine the relative abundance of β- and γ-carotene, an aliquot of the original petroleum ether extract was chromatographed as before, and the two zones which separated were eluted with petroleum ether containing a trace of methanol, the volume of the eluting solvent being the same for the two bands. Values for the molar absorption coefficient of β-carotene[2] and of γ-carotene[3] were taken from the literature. The optical density of the petroleum ether solution of β-carotene was determined at 450 and 477 mμ, and that of γ-carotene was measured at 462 and 494 mμ. From these measurements, four values of the proportion of β- and γ-carotene were calculated. All agreed within 1·4%, and gave and average of 66·5% γ-carotene and 33·5% β-carotene. These values agree within 2·5% with those previously reported for the proportion of these pigments in the telial stage of this rust[4], and within 5·4% with the quantities reported in the pycnial stage[5]. It is noteworthy that the kinds and amounts of carotenoid pigments are essentially identical in three different stages of the rust, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, on different hosts.

F. T. Wolf and F. A. Wolf

Department of Biology, Vanderbilt University, Nashville, Tenn., and Department of Botany, Duke University, Durham, North Carolina, U.S.A., January 14, 1955.

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Carotinoide aus den Äzidien des Rostpilzes *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw. ergab das Vorliegen von 66,5% γ-Carotin und 33,5% β-Carotin (Durchschnittswerte). Diese Werte stimmen mit denjenigen anderer Autoren für Teleuto-Stadium und Pyknidenform überein. Art und Mengenverhältnis der Carotinoide in drei Stadien von *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw. (auf verschiedenen Wirtspflanzen) sind daher ungefähr identisch.

[1] P. Karrer and E. Jucker, *Carotenoids* (Elsevier Publ. Co., N. Y. ,1950), 384 pp.

[2] K. W. Hausser, Z. angew. Chem. *47*, 657 (1934).

[3] R. Kuhn and H. Brockman, Ber. dtsch. chem. Ges. *66*, 407 (1934).

[4] B. L. Smits and W. J. Peterson, Science *96*, 210 (1942).

[5] B. L. Smits and H. L. Mitchell, Science *113*, 296 (1951).

Antagonistische Wirkung von Mucoprotein Gottschalk gegenüber Shearschem Polysaccharid an isolierten Zellen

In den letzten Jahren sind spezifische Wirkungen von Polysacchariden, Mucopolysacchariden und Mucoproteinen tierischer und bakterieller Herkunft an isolierten Zellen beschrieben worden. So wirken nach unseren Befunden stark leukocytenemigrationsfördernd «Polysaccharide» aus gramnegativen Keimen, andere «Polysaccharide» sind Virushämagglutinationshemmer, Fermenthemmer usw.[1].

Es schien von Interesse, zu prüfen, ob diejenigen Polysaccharide, die keine spezifische Wirkung in einem bestimmten Test besitzen, nicht doch Antagonisten gegenüber wirksamen Stoffen sind. Wir hatten aus einzelnen Befunden den Eindruck gewonnen, dass in tierischen Systemen eine grundsätzlich vorhandene Wirkung durch «Inhibitoren» maskiert sein kann.

Es ergab sich, dass die stark leukocytenemigrationsfördernde Wirkung des Shearschen Polysaccharids aus Serratia marcescens[2] durch das Gottschalksche Virusrezeptor-Mucoprotein, das selbst keine Wirkung an Leukocyten zeigt, deutlich gehemmt wird. Werden steigende Konzentrationen des Shearschen Polysaccharids einer gleichen Konzentration von Mucopolysaccharid Gottschalk zugesetzt, so tritt eine mit zunehmender Menge verstärkte, aber doch über den ganzen Bereich der Wirkung deutliche Hemmung der Stimulation auf (Kurve).

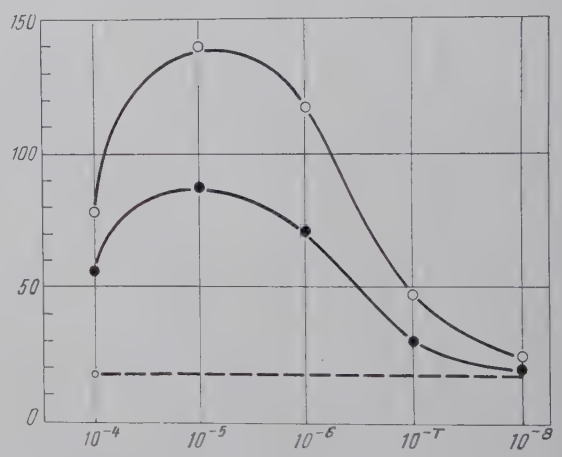


Abb. 1. Beeinflussung der Auswanderung von Leukocyten *in vitro* durch verschiedene Konzentrationen von Shears Polysaccharid und gleichbleibenden Konzentrationen von Gottschalks Mucoprotein. – Ordinate: Auswanderungsfläche in relativem Mass. Abszisse: Konzentration von Shears Polysaccharid. Obere Kurve: Beeinflussung des Auswanderungsareals durch Shears Polysaccharid. Untere Kurve: bei gleichzeitiger Zugabe von Gottschalks Mucoprotein 10^{-4}.

Werden einer konstanten Konzentration des Shearschen Polysaccharides steigende Mengen von Gottschalk-Polysaccharid zugesetzt, so ergibt sich eine analoge antagonistische Wirksamkeit. Wir haben eine

[1] R. Meier und B. Schär, Exper. *10*, 376 (1954). – A. Gottschalk, Int. Symp. *The Dynamics of Virus and Rickettsial Infections* (Blackiston, New York 1954). – F. Abrignani und V. Mutolo. Exper. *10*, 470 (1954).

[2] M. J. Shear und F. C. Turner, J. Nat. Canc. Inst. (Bethesda) *4*, 81 (1943).

Virus-Hämagglutination in Gemischen von Mucoprotein und Polysaccharid

		Konzentration des Mucoprotein (–log)								
		4,0	4,3	4,6	4,9	5,2	5,5	5,7	6,0	∅
Konzentration des Polysaccharids (–log)	4,0	±	+	++	++	++	++	++	++	++
	5,0	0	0	±	+	++	++	++	++	++
	6,0	0	0	0	0	0	0	0	++	++
	∅	0	0	0	0	0	0	0	++	++

0 = keine Agglutination; ± = teilweise Agglutination; + = Agglutination; ++ = rasche Agglutination.

grössere Reihe von derartigen Polysaccharid-Kombinationen untersucht; unter diesen ist die gleiche antagonistische Wirkung des Mucoproteins Gottschalk gegenüber der leukocytenwanderungsfördernden Fraktion aus Schwangernharn, die wir früher beschrieben haben, vorhanden.

Als zweiter Test wurde die Hemmung der Virushämagglutination benützt. Das Gottschalksche Mucopolysaccharid ist in diesem Test primärer Wirkstoff, während das Shearsche Polysaccharid hier unwirksam ist.

Technik. Die Mucoprotein- und Polysaccharidlösungen wurden in 0,9% NaCl hergestellt und in Verdünnungsreihen angelegt. Entsprechend obigem Schema wurden die Gemische mit je 0,1 cm³ der Komponenten hergestellt. Nach $1^1/_4$ h Kontakt bei Zimmertemperatur wurden die Proben regelmässig mit 0,1 cm³ Allantoisflüssigkeit von Influenza-PR_8 infiziertem Hühnerembryo (30 min bei 56° inaktiviert) beschickt. Die Endkonzentration des Indikatorvirus entsprach 4 Hämagglutinationsdosen. Hierauf wurde jede Probe mit 0,1 cm³ 1,6% Hühnererythrocyten versetzt. Ablesung der Hämagglutination nach 1 h Stehenlassen bei Zimmertemperatur.

Die Untersuchungen an Influenzavirus ergaben, dass die durch Gottschalk-Mucoprotein hervorgerufene Hemmung der Virushämagglutination durch steigende Dosen von Shear-Polysaccharid aufgehoben werden kann. Die beigefügte Tabelle zeigt eindeutig diese Beziehung der beiden Stoffe.

Es kann somit kein Zweifel bestehen, dass zwischen diesen beiden Stoffen grundsätzlich ein antagonistisches Verhältnis besteht. Wirkungsmechanismus und Einzelheiten dieser Reaktion sollen abgeklärt werden. Es scheint uns eine Mitteilung dieser Befunde angezeigt, da wohl anzunehmen ist, dass ähnliche antagonistische Beziehungen zwischen «Polysacchariden» auch bei anderen biologischen Systemen von Bedeutung sein können.

R. Meier, B. Schär und F. Kradolfer

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 8. März 1955.

Summary

Shear's Polysaccharide and Gottschalk's Virus-receptor-Mucoprotein are biological antagonists. The latter inhibits the stimulation of leucocytic migration produced by the former. Inhibition of virushaemagglutination by Gottschalk's Mucoprotein is reversed by Shear's Polysaccharide.

Inhibition of Ovary Development in Worker Bees by Extraction Fluid of the Queen

In preliminary experiments[1] it was observed that inhibition of the ovary development in worker bees (*Apis mellifica* L.) was due to direct contact between these bees and a queen, either a living or a dead one. During this contact these bees show a typical behaviour: touching with their antennae and licking with their tongue the body of the queen.

After extraction in aceton or ethanol a queen looses her inhibitory effect. Moreover, every sign of attractiveness to the worker bees has disappeared: she is no longer touched and licked by the bees. After impregnation with the extraction fluid both attractiveness and inhibitory effect are present again: the queen is touched and licked by worker bees as before extraction. In control experiments extraction fluid of *worker bees* was tested in combination with extracted queens. These experiments further substantiate the hypothesis constructed previously[1] concerning the explanation of the inhibition of ovary development in worker bees by a substance present on the body of the queen. It may be mentioned that similar experiments performed with termites[2] point in the same direction.

The use of different extraction methods in our experiments with queens of honeybees reveals a fatty acid character of the inhibiting substance. The results of only one of the experiments are given in the table and the photographs.

Test object	Percent developed ovaries in groups of 50 worker bees
Queenless (control)	82
Queen extracted with aceton	84
Extracted queen impregnated with extraction fluid of queens	18
Extracted queen impregnated with extraction fluid of worker bees	75

Experiments were carried out in order to obtain detailed information concerning the inhibitory mechanism. Extracts of both queens and worker bees were applied not only to extracted queens but also to other objects: worker bees, drones and pieces of wood. In all these cases the *behaviour* of the worker bees pointed to discrimination between these two extracts. When using the ovary development as a testing-method, however, results were in some cases less conclusive.

[1] A. P. de Groot and St. Voogd, Exper. *10*, 384 (1954).
[2] M. Lüscher, Z. vgl. Physiol. *34*, 123 (1952).

In order to obtain more differentiated information about the relation between behaviour of worker bees and degree of ovary development, experimental groups of about 50 bees were observed at regular intervals and those individuals were marked, which touched and licked the impregnated object under observation. These marking experiments led to the peculiar result that during the observational period (2–3 weeks) only a certain number of bees were regularly active, touching and licking the object, whereas others were not marked at all. Ovary development in the former group was less than in the latter one. Obviously under these experimental conditions distribution of the inhibiting substance is lacking or at least insufficient to inhibit the ovary development.

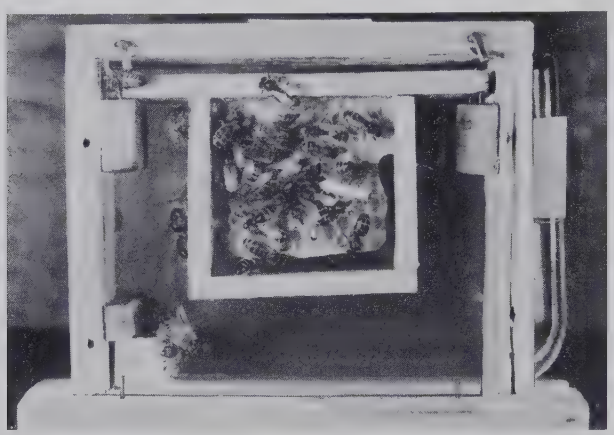


Fig. 1*a*.–Extracted queen impregnated with extraction fluid of queens (arrow indicates queen).

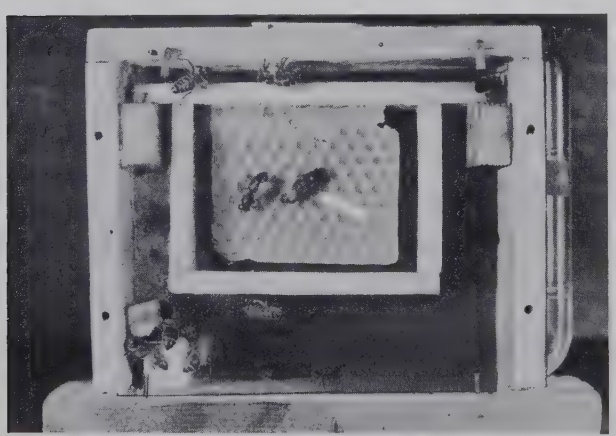


Fig. 1*b*.–Extracted queen impregnated with extraction fluid of worker bees (arrow indicates queen).

The opinion of Butler[1] that bees normally obtain some substance from the body of their queen is in accordance with our results. Butler's results concerning sharing of the "queen substance" amongst the members of a colony, obviating the necessity of direct contact between the queen and each of the worker bees, could be verified in our experiments in so far as sharing of the inhibiting substance was found only in bees *forced* to mutual food transmission.

[1] C. G. Butler, Trans. R. Ent. Soc. Lond. *105*, 11 (1954).

These experiments and those of Butler show clearly the presence of a substance on the body of a queen, which is constantly licked by worker bees. In the present state of our experiments we are inclined to conclude that the existence of this substance is a link in the inhibitory mechanism. It is impossible even to hazard the suggestion that *only* the action of this inhibiting substance can give a satisfactory explanation of the inhibition of the ovary development.

Stien Voogd

Laboratory of Comparative Physiology, University of Utrecht, March 9, 1955.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass der Extrakt einer Königin die Ovarienentwicklung bei den Arbeiterinnen der Honigbiene bei geeigneter Darbietung in gleicher Weise hemmt wie der Körper der lebenden oder toten Königin selbst. Die hemmende Substanz hat den Charakter einer Fettsäure. Extrakte von Arbeiterinnen haben diese Wirkung nicht. Durch Markierungsversuche wurde festgestellt, dass in Versuchsgruppen von je 50 Arbeitsbienen nur ein Teil der Tiere die hemmende Substanz aufnimmt; bei diesen Tieren entwickeln sich die Ovarien deutlich weniger stark als bei den übrigen. Indirekte Übertragung der hemmenden Substanz (von einer Arbeiterin zur anderen) fand unter diesen Umständen also nicht oder in ungenügendem Umfang statt. Die erwähnte Substanz dürfte nur ein Glied in der Kette der Faktoren darstellen, die normalerweise zur Hemmung der Ovarienentwicklung führen.

Adrenergic Blockade by Iproniazid

It has been shown that 1-isonicotinyl-2-isopropylhydrazine (iproniazid)[1] is a potent inhibitor of mono amine oxidase *in vivo*[2] and *in vitro*[3]. It has also been shown that iproniazid is able to potentiate the pharmacological action of certain sympathomimetic amines such as tyramine and phenylethylamine[4]. In the course of these studies the possibility of another action of iproniazid on the sympathetic system arose. Iproniazid and epinephrine are structurally related in some respects so that a competition of the two compounds for adrenergic receptors might take place. In testing this assumption, responses of the circular smooth muscle of rabbit aorta in muscle bath were utilized according to the method of Furchgott[5]. Sixteen minutes after the application of 10^{-3} molar iproniazid a reduction of 60·6% ($\pm$ 8·9) of the contraction produced by 10^{-7} molar epinephrine was observed (9 experiments). Removal of the iproniazid by repeated washings caused a disappearance of the inhibition as shown by a return to normal contraction of the aortic strip. The adrenergic block caused by iproniazid is therefore completely and easily reversible in contrast to that produced by dibenamine[6]. In agreement

[1] IIH, Marsilid.

[2] E. S. Zeller, J. Barsky, J. R. Fouts, W. F. Kirchheimer, and L. A. Van Orden, Exper. *8*, 349 (1952).

[3] E. A. Zeller and J. Barsky, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. *81*, 459 (1952).

[4] E. C. Griesemer, J. Barsky, C. A. Dragstedt, J. A. Wells, and E. A. Zeller, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. *84*, 699 (1953).

[5] R. F. Furchgott and S. Bhadrakom, J. Pharm. and Exper. Ther. *108*, 129 (1953).

[6] M. Nickerson, Pharm. Rev. *1*, 27 (1949).

with these observations, it has been found that iproniazid inhibits the response of the cat nictitating membrane to epinephrine.

E. C. Griesemer, C. A. Dragstedt, J. A. Wells, and E. A. Zeller

Departments of Pharmacology and Biochemistry of the Northwestern University Medical School, Chicago, Ill., March 22, 1955.

Zusammenfassung

1-Isonicotinyl-2-isopropylhydrazin (Iproniazid) blokkiert reversibel den Angriffsort des Adrenalins im Furchgottschen Präparat der Kaninchenaorta. Die Wirkung wird der strukturchemischen Ähnlichkeit zwischen Adrenalin und Iproniazid zugeschrieben.

Utilization of Exogenous Adenine by the Rat

We have previously speculated on the possibility of a complex path for the incorporation of exogenous purines and for biological interconversions among the purines[1]. Greenberg[2] has made the interesting observation that in pigeon liver the purine ring of hypoxanthine may be completed after introduction of the ribose and phosphate residues. Other investigators have since presented evidence which suggests the hypothesis that ring-opened intermediates, at the riboside or ribotide level are involved in purine interconversions and synthesis.

Thus Flavin and Engelman[3] have noted a discrepancy between specific activities of administered guanine-C^{14} and nucleic acid guanine isolated from *Tetrahymena gelii*. The possibility of exchange of the 8-carbon was ruled out by these authors based on the nutritional inertness of 2,4-diamino-5-formylamino-6-hydroxypyrimidine and 4-formamido-5-imidazole carboxamide. However, nothing is said of the possibility of ribosides or ribotides of these compounds being involved. In this connection Ben Ishai *et al.*[4] have shown that the riboside of 4-amino-5-imidazole carboxamide is effective in promoting the growth of an *Escherichia coli* mutant. Further, there is evidence that 4-formamidoimidazole-5-carboxamide is utilized by mutants of *E. coli*[5], and that the free amine is utilized by yeast[6], *Lactobacillus arabinosus*[7], pigeon liver homogenates[8], a mutant of Ophistioma[9], and by the intact rat[10]. Finally Buchanan *et al.* have found that incubation of radioactive 4-amino-imidazole-5-carboxamide with inosinic acid and hypoxanthine resulted in four to five times more activity in the inosinic acid than in the hypoxanthine, showing that the elements of ribose and phosphate are added to the carboxamide prior to ring closure with 'active' formate[11].

[1] M. Gordon, Science *114*, 2952 (1951).
[2] G. R. Greenberg, J. Biol. Chem. *190*, 611 (1951).
[3] M. Flavin and M. Engelman, J. Biol. Chem. *200*, 59 (1953).
[4] R. Ben Ishai, E. D. Bergmann, and B. E. Volcani, Nature *168*, 1124 (1951).
[5] E. D. Bergmann, R. BenIshai, and B. E. Volcani, J. Biol. Chem. *194*, 531 (1953).
[6] W. J. Williams, Fed. Proc. *10*, 270 (1951).
[7] W. Shive, Ann. New York Acad. Sci. *52*, 1225 (1950).
[8] M. P. Schulman, J. M. Buchanan, and C. S. Miller, Federation Proc. *9*, 225 (1950).
[9] N. Fries, S. Bergstroem, and M. Rottenberg, Physiol. Plantarum *2*, 210 (1949).
[10] C. S. Miller, S. Curin, and D. W. Wilson, Science *112*, 654 (1950).
[11] J. M. Buchanan, J. Cell. Comp. Physiol. *38*, 143 (1951).

Greenberg has obtained similar results as mentioned above[1].

We have studied the incorporation of adenine-8-C^{13} into rat[2] purines under conditions almost identical with those used by Brown *et al.*[3] for adenine-1,3-N^{15}. The much lower incorporation of 8-labeled adenine (Table) may be evidence for ring opening in the incorporation of exogenous purines. These conclusions are not in agreement with those in the study by Marrian *et al.*[4] based on doubly labeled adenine. The reports by Schulman and Buchanan[5] and by Greenberg[6] that the 2-carbon seems to be more labile than the 8-carbon suggest that experiments on feeding of 2,4-C^{14} and 4,8-C^{14} labeled adenine might give definitive information on the lability of the 2- and 8-carbons of exogenous adenine in the rat.

Table.–Feeding of Adenine-8-C^{13} (30 mg per kilo per day)

Fraction	Atom percent Excess C-13	Atom % C-13 calculated on basis of 100% C-13 in Adenine fed
Dietary Adenine-8-C^{13}	6·67	100·0
Allantoin	0·035	0·525
Urea	0·216	3·24
Purine Hydrochlorides	0·035	0·525

Feeding of Adenine-1,3-N^{15} (27 mg per kilo per day)[4]

Fraction	Atom percent Excess N-15	Atom % N-15 calculated on basis of 100% N-15 in Adenine fed
Dietary Adenine-1,2-N^{15}	6·29	100·0
Allantoin	0·348	5·53
Urea	0·003	0·05
Purine Hydrochlorides	0·23	3·65

75 mg of adenine-8-C^{13} was incorporated into 150 g of rat feed biscuits, the adenine having been first diluted with some glucose. Five adult male rats (Sherman strain) totalling 750 g were fed the above diet at the rate of 10 g per rat per day for three days. On the morning of the fourth day the rats were fed unlabeled diet and then sacrificed in the afternoon. The diet had been formed into wafers and dried to minimize loss during feeding. The organs were removed and frozen in dry ice methanol solution. The combined frozen organs were homogenized three times with ethanol and once with dry ether, filtering each time. The pale pink powder was stirred once with hot ethanol and filtered, and this step was repeated with dry ether. The dry powder amounted to 18 g.

17 g of dry, powdered organs were extracted with 10% sodium chloride solution and the free nucleic acids were obtained by the method of Plentl and Schoenheimer[7]. The purine hydrochlorides were obtained by the usual procedures[7].

[1] G. R. Greenberg, Fed. Proc. *9*, 179 (1950).
[2] M. Gordon, J. Chem. Soc. *1954*, 757.
[3] G. B. Brown, P. M. Roll, A. A. Plentl, and L. F. Cavalieri, J. Biol. Chem. *172*, 469 (1953).
[4] D. H. Marrian, V. L. Spicer, M. E. Balis, and G. B. Brown, J. Biol. Chem. *189*, 533 (1951).
[5] M. P. Schulman, J. M. Buchanan, and C. S. Miller, Federation Proc. *9*, 225 (1950).
[6] G. R. Greenberg, Federation Proc. *9*, 179 (1950).
[7] A. A. Plentl and R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. *153*, 203 (1944).

Allantoin was isolated as the mercuric salt[1], and urea was isolated as the dixanthydrol[2].

The mass spectrometer results are given in the Table for our experiment and that of Brown *et al.*[1].

It will be seen that from a comparison of our data with those of the N-15 experiment there is markedly less incorporation of the 8-carbon than of the 1,3-nitrogens of dietary adenine into nucleic acid purines. We thus find support for our earlier hypothesis regarding the complex path, involving ring opening, followed in the incorporation of exogenous purines.

The author is indebted to Sir Charles Harington for his generous gift of isotopically labeled formic acid, to Prof. A. Haddow for providing animal facilities, and to Dr. R. Bentley for mass Spectrometer measurements. This work was done during the tenure of a British-American exchange fellowship of the American Cancer Society and the British Empire Cancer Campaign.

M. Gordon[3]

Imperial College of Science and Technology, London, January 20, 1955.

Zusammenfassung

Der Einbau von oral an Ratten verabreichtem Adenin-8-C^{13} in den Purinanteil der Nukleinsäuren wurde mit den in der Literatur für die Aufnahme von Adenin-1,3-N^{15} beschriebenen Werten verglichen. Die wesentlich geringere Aufnahme von Adenin-8-C^{13} lässt darauf schliessen, dass der Einbau von exogenen Purinen unter Ringöffnung erfolgt.

[1] G. B. Brown, P. M. Roll, A. A. Plentl, and L. F. Cavalieri, J. Biol. Chem. *172*, 469 (1953).

[2] O. Fosse, Ann. Chem. *6*, 13 (1916).

[3] Present address: Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, New Jersey.

Über ein carcinostatisch wirksames Hydrochinonderivat

Vor kurzem haben Domagk, Petersen und Gauss in der Zeitschrift für Krebsforschung über 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon (I) berichtet[1]. Die Verbindung wirkt nach diesen Autoren auf das Wachstum des auf Ratten intramuskulär implantierten Yoshida-Sarkoms (Ascites-Form) hemmend.

Wir hatten diese Substanz schon 1½ Jahre vor der Domagkschen Publikation hergestellt und waren zu jenem Zeitpunkt bereits einen Schritt weiter gelangt, hatte sich doch nach Untersuchungen von Loustalot, Schär und Meier[2] in unseren biologischen Laboratorien herausgestellt, dass das rot gefärbte Bis-äthylenimino-benzochinon bei peroraler Gabe[3] das Wachstum von überimpfbaren Mäuse- und Rattentumoren wenig hemmte. Demgegenüber erwies sich an einem breiten Spektrum von sieben überimpfbaren Tumoren, ebenfalls bei peroraler Applikation, ein ursprünglich als Nebenprodukt gewonnenes, farbloses Hydrochinonderivat bei entsprechender Dosierung von aussergewöhnlicher Wirksamkeit[2].

Veranlasst durch die eingangs erwähnte Publikation sei daher über diese Substanzgruppe schon jetzt berichtet.

Das nun von Domagk beschriebene 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon (I) wird in besonders guter Ausbeute bei der Einwirkung von zwei Mol Äthylenimin auf drei Mol Benzochinon erhalten.

Anders verläuft die Reaktion, wenn auf ein oder mehr Mole Äthylenimin nur ein Mol Benzochinon verwendet wird. Anfangs bildet sich dabei nur das Chinonderivat I. Im Laufe mehrerer Stunden entsteht jedoch ein hellrötliches Kristallgemisch, in welchem man unter dem Mikroskop die orangen Rhomboeder des Chinons, nebst weisslichen, mikrokristallinen Konglomeraten erkennt. Diese schmelzen nicht bis 310° und sind unlöslich in Wasser und allen organischen Lösungsmitteln. Ihre Analyse stimmt auf 2,5-Bis-äthylenimino-hydrochinon (II).

Die neue Verbindung II ist in 2-n. Natronlauge löslich, und wird von überschüssigem Benzochinon bei 80° glatt zum Bis-äthylenimino-benzochinon (I) oxydiert. Umgekehrt lässt sie sich aus dem Chinon I durch Hydrierung gewinnen.

Weitere Untersuchungen legten jedoch die Vermutung nahe, dass das 2,5-Bisäthylenimino-hydrochinon nicht als solches, sondern als *inneres Salz III* vorliegt. Diese Annahme wird durch das IR.-Spektrum bestätigt: eine C=O- oder eine OH-Bande fehlt völlig, dafür treten bei 3,67 und 3,88 μ Absorptionen auf, die auf Ladungsverschiebungen hindeuten. Vermutlich ist aber dieses innere Salz III nicht monomer ($x = 1$), sondern bildet eine Art Ionengitter, in dem zwei oder mehrere Hydrochinonkerne intermolekular ihre Protonen ausgetauscht haben, so dass der Sauerstoff der einen Molekel dem Stickstoff einer zweiten gegenüber liegt und so fort. In der Formel III könnte x daher einen hohen Wert haben.

Das Auftreten eines solchen Hydrochinons in der Form eines inneren Salzes und seine Tumorwirksamkeit waren so bemerkenswert, dass eine weitere chemische Bearbeitung angezeigt schien.

Zunächst war es möglich, die Reaktion so zu leiten, dass nur das Hydrochinon III, nicht aber Bis-äthylenimino-benzochinon (I) entstand.

Dann wurde die Frage abgeklärt, ob bisher bei der Darstellung von Aminochinonen bei uns und anderwärts[1] das Auftreten von Aminohydrochinonen übersehen worden wäre. Dazu wurde die Reaktion zwischen Benzochinon und Piperidin bzw. Benzochinon und Pyrrolidin herangezogen. Im ersteren Fall isolierten wir nur die bereits bekannten, permanganatfarbigen Prismen des 2,5-Bis-piperidino-benzochinons (IV)[2]. Einzig bei Anwendung eines grossen Überschusses an Piperidin liess sich neben viel harzigen Produkten eine sehr geringe Menge des weissen, schwer löslichen 2,5-Bis-piperidino-hydrochinons (V) gewinnen. Bei der Reaktion von Benzochinon und *Pyrrolidin* konnte hingegen überhaupt kein Hydrochinon VII entdeckt werden; es entstanden nur die karminroten Platten des 2,5-Bis-pyrrolidino-benzochinons VI. *Trimethylenimin* lieferte ebenfalls nur ein Chinon, das in violetten Prismen kristallisierende 2,5-Bis-trimethylenimino-benzochinon. *Demnach verläuft die Reaktion mit den höheren Homologen des Äthylenimins ganz verschieden von derjenigen mit Äthylenimin selbst.*

Aus diesen Chinonen durch Reduktion erhaltene Hydrochinone, nämlich das erwähnte 2,5-Bis-piperidino-hydrochinon (V) und das 2,5-Bis-pyrrolidino-

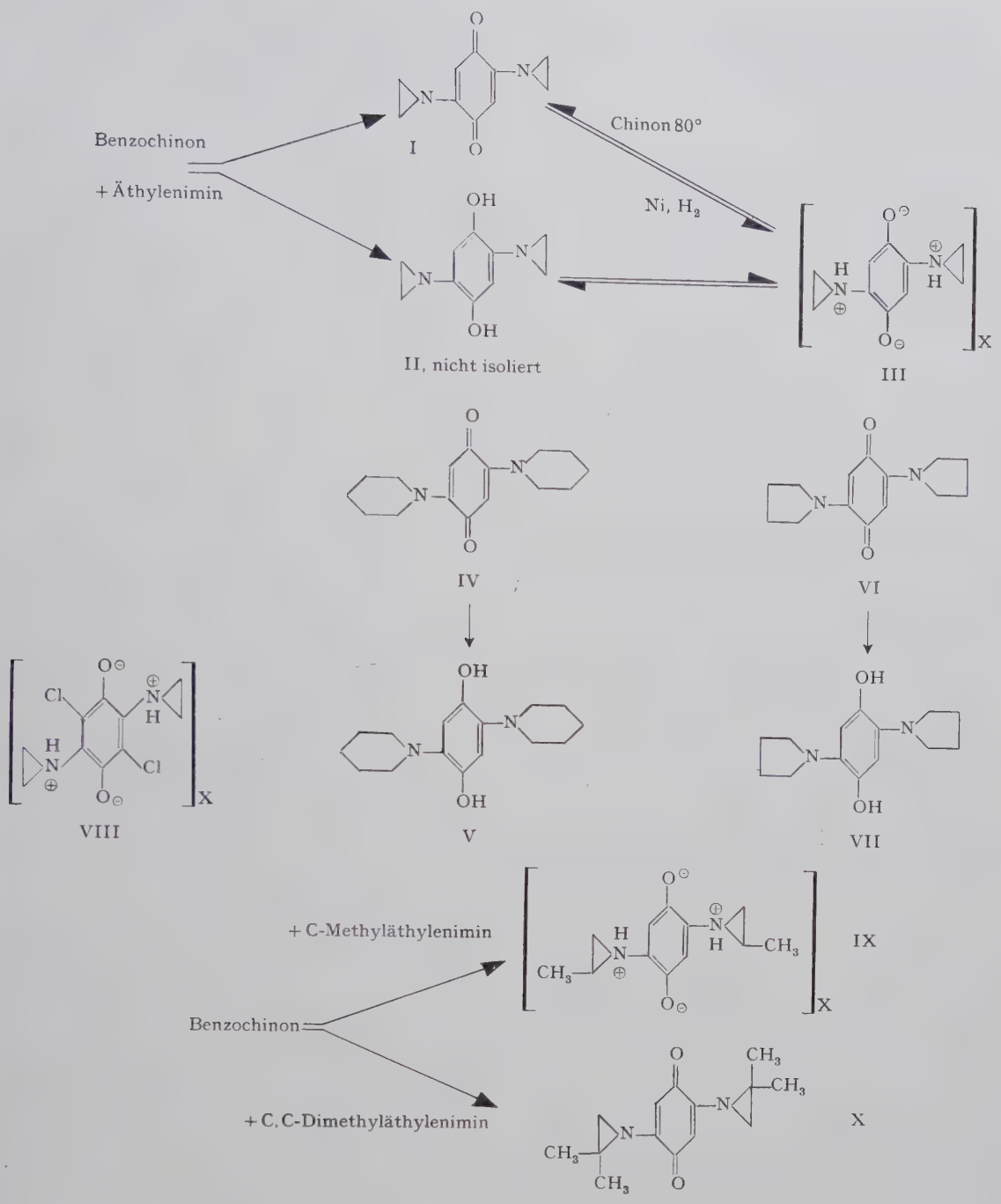
[1] G. Domagk, S. Petersen und W. Gauss, Z. Krebsforschung *59*, 617 (1954).

[2] P. Loustalot, B. Schär und R. Meier, vgl. die nachfolgende Arbeit, Exper. *11*, 186 (1955).

[3] Die Verbindung ist in Wasser schwer löslich.

[1] Vgl. die Zusammenfassung bei M. Martynoff und G. Tsatsas, Bull. Soc. Chim. Fr. *14*, 52 (1947), und C. J. Cavallito, A. E. Soria und J. O. Hoppe, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 2661 (1950).

[2] B. Lachowicz, Mh. Chem. *9*, 506 (1888).



hydrochinon (VII), erwiesen sich in ihren Eigenschaften interessanterweise recht verschieden vom 2, 5-Bis-äthylenimino-hydrochinon III; waren sie doch im Gegensatz zu diesem in Natronlauge beinahe unlöslich. Dafür wurden stabile Dihydrochloride erhalten. Ferner haben beide Verbindungen einen definierten Schmelzpunkt. Schliesslich sind sie, im Gegensatz zu III, wie alle o-Aminophenole, an der Luft leicht oxydierbar. Die letztgenannten Unterschiede lassen sich am ehesten durch das Ausbleiben einer inneren Salzbildung erklären. Die IR.-Spektren bestätigen diese Annahmen.

All diese Befunde legen den Schluss nahe, dass dem 2, 5-Bis-äthylenimino-hydrochinon in der Tat *chemisch und biologisch eine Sonderstellung zukommt*, indem die Existenz seines inneren Salzes eng mit der Äthylenimin-struktur verknüpft scheint, ist doch von keinem Aminophenol die Bildung eines inneren Salzes bekannt[1].

Die gleiche innere Salzbildung lässt sich auch beim 2, 5-Dichlor-3, 6-bis-äthylenimino-hydrochinon VIII erkennen.

Von grösstem Interesse waren in diesem Zusammenhang Untersuchungen mit C-Methyl-äthylenimin und C, C-Dimethyl-äthylenimin. Ersteres ergab bei der Umsetzung mit Benzochinon das *innere Salz* des 2, 5-Bis-(C-methyl-äthylenimino)-*hydrochinons* (IX), während letzteres mit den gleichen Mengenverhältnissen nur das 2, 5-Bis-(C, C-dimethyl-äthylenimino)-benzo*chinon* (X) lieferte[1].

[1] Für die Interpretation dieser Befunde vgl. die ausführlichere Mitteilung in den Helv. chim. Acta.

So ist anscheinend bei der Bildung farbloser, innerer Hydrochinonsalze vom Typus III, VIII und IX das *Äthylenimin* sowie das *C-Methyl-äthylenimin* besonders bevorzugt.

Für die Aufnahme und Diskussion der IR.-Spektren sei Herrn Dr. E. Ganz gedankt.

A. Marxer

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, den 21. Februar 1955.

Summary

The reaction between benzoquinone and two or more mols ethylenimine yields a white insoluble compound which is the internal salt of 2,5-bis-ethyleniminohydroquinone, an unusual formation not yet described in the literature. C-Methyl-ethylenimine forms a similar hydroquinone salt, whilst other cyclic or non cyclic amines, such as piperidine, pyrrolidine, trimethylenimine, dimethylamine and C,C-dimethyl-ethylenimine give 2,5-disubstituted benzoquinones. According to the findings of Loustalot, Schär and Meier 2,5-Bis-ethylenimino-hydroquinone has proved to be of remarkable efficacy in seven kinds of transplantable tumors. It would seem, therefore, that this compound has, both chemically and biologically, interesting qualities.

Über antimitotische und tumorhemmende Eigenschaften des inneren Salzes des 2,5-Bis-Äthylenimino-hydrochinons

Unter den tumorhemmenden Stoffen finden sich verschiedene Substanzgruppen mit chemisch hoch reaktionsfähigen Substituenten. Einzelne dieser Stoffe besitzen therapeutische Wirkungen. Ihre Anwendung ist aber durch die ungenügende Spezifität der Wirkung erschwert. Die folgende Mitteilung gibt ein Beispiel dafür, dass in einer Gruppe solcher Verbindungen, bei systematischer Abwandlung, ein Vertreter gefunden werden kann, bei dem eine breite tumorhemmende Wirkung mit besonderer Beschränkung auf das bösartige Gewebe vorhanden ist. Im vorliegenden Falle handelt es sich um das von Marxer[1] synthetisierte innere Salz des 2,5-Bis-Äthylenimino-hydrochinons.

Unter den Chinonen sind am Tubifex-Ei mitosehemmende Vertreter von Lehmann[2] beschrieben worden. Untersuchungen von Meier und Mitarbeitern[3] und später von Friedmann und Mitarbeitern[4] haben gezeigt, dass zahlreiche Chinone und Hydrochinone die Zellteilung von *in vitro* gezüchteten Fibroblasten des höheren Tieres hemmen. Tumorhemmung am Tier durch verschiedene Chinonderivate wurde von Badger und Mitarbeitern[1], Powell[2] und andern beschrieben. Die mitose- und tumorhemmende Wirkung von Äthyleniminoverbindungen ist besonders für das Triäthylenmelamin bekannt. Ein Chinon, das zusätzliche reaktive Gruppen trägt, ist bisher nur von Domagk und Mitarbeitern[3] beschrieben worden. Seine Wirkung ist auch nach unseren eigenen Befunden gering. Um so bemerkenswerter ist es, dass die oben genannte Verbindung eine ungewöhnlich starke und breite tumorhemmende Wirkung besitzt:

Das innere Salz des 2,5-Bis-Äthylenimino-hydrochinons bedingt in einer Konzentration von etwa 10^{-6} bis 10^{-7} bei *in vitro* gezüchteten Hühnergefässfibroblasten und Lungenepithelien nach 8 h Störungen des Mitoseablaufes, die sich von denjenigen, verursacht durch einfach gebaute Hydrochinone, unterscheiden. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass ihm auch eine Wirkung auf den Nucleolus des Ruhezellkernes zukommt. Ähnliche Effekte finden sich bei Triäthylenmelamin. Die Wirksamkeit der vorliegenden Verbindung ist wesentlich höher. Dem untersuchten Hydrochinonderivat kommt somit eine vielgestaltige Wirkung auf *in vitro* proliferierende Zellen zu.

Bei einer akuten peroralen Toxizität von 150 mg/kg zeigt das Präparat bei etwa halbletalen peroralen Dosen, die während 6tägiger Verabreichung eben noch toleriert werden, eine Hemmung des Wachstums eines breiten Tumorspektrums (Methode: Schär und Mitarbeiter[4]). Folgende überimpfbare Mäuse- und Rattentumoren werden um 25–75% und mehr in ihrem Wachstum gehemmt: Crocker-Sarcom 180, Ehrlich-Carcinom, Adeno-Carcinom EO 771, Adeno-Carcinom Ciba, Osteogenes Sarcom Ciba, Walker-Carcinosarcom 256, Flexner-Joblin-Carcinom. Das Wachstum des Walker-Carcinosarcom 256 wird fast vollständig gehemmt. Die tägliche perorale Behandlung während 27 Tagen mit 30 mg/kg von Ratten mit dem Walker-Carcinosarkom 256 beimpft, verursacht bei einer rund 50%igen Hemmung des Wachstums schwere histologisch nachweisbare Schädigungen des Tumorgewebes (Abb. 1). Die tumorhemmende Wirkung des untersuchten Hydrochinonderivates ist unter bestimmten Versuchsanordnungen im histologischen Befund auffallend spezifisch, da stark proliferierende, normale Gewebe praktisch keine Läsionen zeigen (Abb. 2).

P. Loustalot, B. Schär und R. Meier

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 24. März 1955.

Summary

A new hydroquinone compound, the internal salt of 2,5-bis-ethylenimino-hydroquinone, has a multiform antimitotic effect and a potent tumor-inhibiting action on a wide spectrum of inoculated tumors of mice and rats. On the other hand, normal tissues undergoing intensive cell division do not appear to be affected adversely from the histological standpoint.

[1] A. Marxer, Exper. *11*, 184 (1955).

[2] F. E. Lehmann, Verh. Schweiz. Physiol. *1942*. – F. E. Lehmann und H. Hadorn, Helv. physiol. pharm. Acta *4*, 11 (1946).

[3] R. Meier und M. Allgöwer, Exper. *1*, 57 (1945). – R. Meier und B. Schär, Exper. *3*, 358 (1947).

[4] E. Friedmann, D. H. Marrian und I. Simon-Reuss, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy *3*, 263 (1948).

[1] G. M. Badger, L. S. Elson, A. Haddow, C. L. Hewett und A. M. Robinson, Proc. Roy. Soc. [B] *130*, 255 (1941).

[2] A. K. Powell, Brit. J. Cancer *5*, 264 (1951).

[3] G. Domagk, S. Petersen und W. Gauss, Z. Krebsforschung *59*, 617 (1954).

[4] B. Schär, P. Loustalot und F. Gross, Klin. Wschr. *32*, 49 (1954).

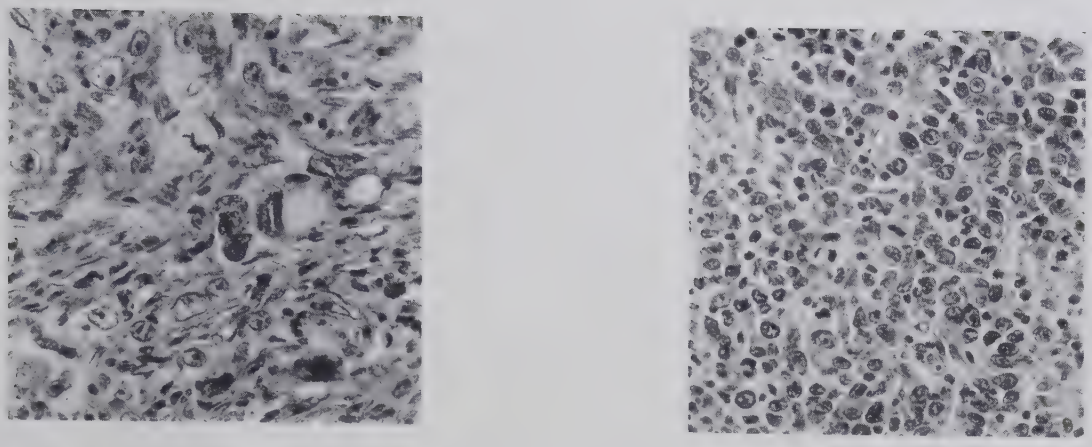


Abb. 1. Links: Walker-Carcinosarcom 256 (auf Sherman-Ratte), 28 Tage alt. Behandlung: 27 × 30 mg/kg po täglich des inneren Salzes des 2,5-Bis-Äthyleniminohydrochinons. Starke Schädigung des Tumorgewebes: vereinzelte grosse, atypische Tumorzellen, Fibro blastenproliferation, Vernarbung. Rechts: Walker-Carcinosarcom 256 (auf Sherman-Ratte), 28 Tage alt, unbehandelt.

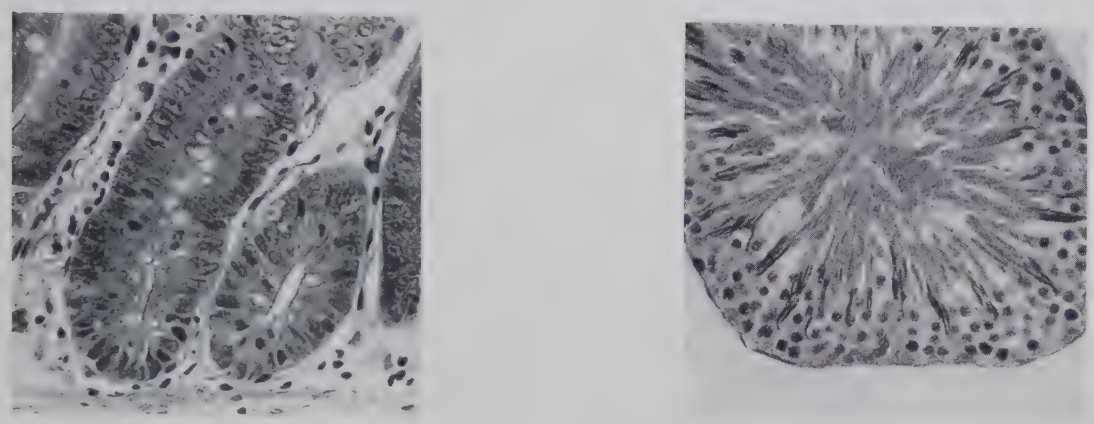


Abb. 2. Dünndarm und Hoden des Tieres, dessen geschädigter Tumor links auf Abbildung 1 wiedergegeben ist. Beachte das normale Aussehen dieser zwei Organe. Alle Aufnahmen 285mal vergrössert. Färbung HE.

La vitesse d'incorporation du C^{14} dans les acides gras chez la souris

La rapidité de la biosynthèse et du métabolisme des acides gras dans le foie chez les souris et les rats a été étudiée par l'incorporation du C^{14} à partir d'acétate marqué[1]. Le maximum d'activité trouvé entre 10 et 40 min après l'injection intrapéritonéale a été controversé par Van Bruggen *et al.*[2], et a fait l'objet de nouvelles recherches.

Des souris blanches d'une même portée ont été injectées de 2 μC d'acétate de soude 1–C^{14} dans le péritoine et sacrifiées par groupe de quatre après des temps exactement délimités. Les activités spécifiques des acides gras isolés après extraction et saponification des lipides ont été mesurées en couche «infiniment épaisse»[3].

Les résultats en fonction du temps ont été exprimés également en pour-cent d'incorporation relative par rapport au poids total des acides gras des foies de chaque groupe.

L'activité spécifique des acides gras du foie provenant de la saponification des phospholipides et des graisses neutres parcourt le même schéma. Dans les 60 min suivant l'injection d'acétate marqué, cette activité présente une fluctuation, passant alternativement par un maximum et un minimum. L'activité des acides gras du muscle parcourt les mêmes fluctuations avec maximum prononcé 15 min après l'injection.

Par contre la radioactivité du sang total ne présente que des légères variations qui ne suivent pas celles des acides gras; le C^{14} s'y trouvant incorporé dans divers autres composants, tels les protéines, glucides, urée et bicarbonate.

Ces expériences ont été reprises d'une manière similaire; les résultats en sont donnés dans le Tableau III.

Les maxima bien que ne se retrouvant pas toujours exactement aux mêmes temps, n'en sont pas moins toujours décelables, confirmant la synthèse et le catabolisme rapides des acides gras du foie ou tout au moins d'une fraction de ceux-ci. Les temps expérimentaux arbitrairement choisis, ne sont que des moments d'un équilibre entre la synthèse ou la destruction des acides gras. Plus les temps choisis seront nombreux, plus la courbe se rapprochera de la courbe idéale correspondant au cours normal du métabolisme.

[1] G. Hevesy, R. Ruyssen et M. L. Beeckmans, Exper. *7*, 144 (1951). – R. Ruyssen et L. Vandeputte, Meded. Koninkl. Vl. Acad., Wetensch. *13*, n° 10 (1951). – R. Ruyssen et H. Anciaux, Internat. Colloquium on Lipids 1953, Koninkl. Vl. Acad., Wetensch., p. 299 et suiv. – H. Anciaux, Verh. Koninkl. Vl. Acad., Wetensch. *14*, n° 37 (1952).

[2] J. van Bruggen, T. Hutchens, C. Claycomb et E. West, J. Biol. Chem. *200*, 31 (1953).

[3] R. Ruyssen et L. Vandeputte, Meded. Koninkl. Vl. Acad., Wetensch. *13*, n° 10 (1951). – H. Anciaux, Verh. Koninkl. Vl. Acad., Wetensch. *14*, n° 37 (1952).

Tableau I. Foie: Activité spécifique et incorporation en pour-cent de l'activité de l'acétate injecté. Chaque valeur représente la moyenne de quatre souris.

		Temps écoulé après injection (en minutes)					
		5	10	15	30	45	60
Acides gras totaux	Activité spécifique (en c.p.m.)	358	75	435	116	198	93
	Incorporation (en %)	24,7	6,0	24,3	8,9	12,1	5,1
Acides gras extraits des phospholipides	Activité spécifique (en c.p.m.)	202	59	352	114	174	96
	Incorporation (en %)	—	1,8	7,8	3,3	4,7	2,4
Acides gras extraits des graisses neutres	Activité spécifique (en c.p.m.)	491	86	572	142	252	118

Tableau II. Muscles: Activité spécifique et incorporation en pour-cent de l'activité de l'acétate injecté. Chaque valeur représente la moyenne de quatre souris.

		Temps écoulé après injection (en minutes)					
		5	10	15	30	45	60
Acides gras totaux	Activité spécifique (en c.p.m.)	3,4	1,1	5,1	3,1	2,8	3,0
	Incorporation (en %)	0,10	0,03	0,12	0,08	0,04	0,07

Tableau III. Foie: Activité spécifique et incorporation en pour-cent de l'activité de l'acétate injecté. Chaque valeur représente la moyenne de quatre souris.

		Temps écoulé après injection (en minutes)						
		5	10	15	30	45	60	90
Acides gras totaux	Activité spécifique (en c.p.m.)	57	224	416	233	144	284	59
	Incorporation (en %)	5,5	17,5	24,6	13,3	7,7	17,1	4,2

Les injections combinées de C^{14} et P^{32} montrent la différence existant entre l'incorporation de ces deux éléments. L'incorporation du P^{32} dans les phosphatides présente une lente augmentation; elle n'atteint une valeur maximale qu'entre 6 et 12 h après l'injection.

Ces travaux ont été subsidiés par l'Institut de Physique nucléaire belge.

R. Ruyssen et H. Anciaux

Laboratoire de Chimie médicale et de chimie physique biologique, Université de Gand, le 21 décembre 1954.

Summary

The determination of the rate of incorporation of C^{14} in the fatty acids of the glycerides and the phosphatides confirms their rapid metabolism in the liver of mice (maxima at about 10–60 min).

Oxidases of *Polystictus versicolor*

Many basidiomycetes produce abundant polyphenol oxidase in culture[1]. Since it has been suggested that this enzyme may act as a terminal oxidase in respiration[2] it was considered of interest to see whether or not this was so for *Polystictus versicolor* (Linn.) Fr. which is known to produce abundant laccase[3].

Flasks containing a liquid medium of 2% malt extract and 2% peptone were inoculated with mycelium that had been blended in a Waring blendor. In shake culture the fungus grew as small pellets. Since the respiration rate of the pellets was not increased by allowing them to respire in pure oxygen it was considered that oxygen was not limiting the respiration rate within the pellet. This method of growth ensured homogeneous material[1] and the washed pellets were pipetted directly into Warburg flasks for respiration measurements. The respiration was measured by determining the oxygen uptake of the intact mycelium in the presence and absence of respiratory inhibitors. The usual precautions to ensure maximum effectiveness and degree of selectivity of the inhibitors were employed[2].

As can be seen from the table, cyanide which inhibits heavy metal containing enzymes caused approximately 80% inhibition of the respiration. 95% carbon monoxide with 5% oxygen mixtures caused 43% to 65% inhibition, most of which was reversible by light and this is characteristic of cytochrome oxidase mediated respiration[3]. Salicylaldoxime, dieca and phenylthiourea which inhibit copper containing enzymes caused only 4% to 13% inhibition. This inhibition might indicate the participation of a copper-containing enzyme in respiration but could also be due to a non-selective effect of the inhibitors on the cytochrome oxidase.

[1] G. Lindeberg, Physiol. Plant. *1*, 196 (1948).
[2] W. O. James, Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc. *28*, 245 (1953).
[3] G. Fåhraeus, Physiol. Plant. *5*, 284 (1952).

[1] J. W. Foster, *Chemical Activities of Fungi* (Acad. Press Inc., New York, 1949).
[2] W. O. James, Ann. Rev. Plant. Physiol. *4*, 59 (1953).
[3] W. O. James, Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc. *28*, 245 (1953).

Table I.–Effect of Various Inhibitors on the Respiration of *Polystictus versicolor*

Expt. No.	pH at which inhibitor applied	Inhibitor	% inhibition
L 8	7	95% CO with 5% O_2 } in the light	10
	7	95% CO with 5% O_2 } in the dark	65
L 10	7	95% CO with 5% O_2 } in the light	0
	7	95% CO with 5% O_2 } in the dark	43
L 9a	7	1 mM KCN	70
L 9b	7	1 mM KCN	80
L 9c	7	1 mM KCN	80
L 11	5	0·2 mM diethyldithiocarbamate Na salt (dieca)	12
	5	saturated solution phenylthiourea	4
	5	saturated solution phenylthiourea	13
L 12a	5	1 mM salicylaldoxime	13
L 12b	5	1 mM salicylaldoxime	4

Spectroscopic evidence of the presence of cytochromes was obtained. Bands corresponding to the alpha absorption bands of the reduced cytochromes *a*, *b* and *c* were observed with a Hilger microspectroscope when light from a 500 W metal filament lamp was passed through a thick suspension of the mycelium to which sodium hydrosulphite had been added[1].

Cell free extracts of the mycelium were prepared by grinding the well washed mycelium with clean sand and ice cold buffer in a chilled mortar (9 parts of 0·05 *M* phosphate buffer pH 7·0 to 1 part of moist mycelium). Cell debris and sand were removed by centrifuging at 500 g for 5 min. Extra-cellular laccase preparations were prepared by the method of Lindeberg and Holm[2].

Table II.–Activities of Enzyme Extracts from a 7-day Old Culture of *Polystictus versicolor*

Enzyme system	Substrate	pH	$Q \cdot O_2$ dry weight ($\mu\delta l$ O_2 per mg per h)
Cytochrome oxidase	Hydroquinone	7·0	24
Extra-cellular laccase	Pyrocatechol	5·2	30
Laccase from intact mycelium	Pyrocatechol	5·2	1·0

For measurements of enzyme activities the Warburg flasks contained 1 ml enzyme preparation, 5 mg substrate in the sidearm, 0·15 ml 15% KOH in the centre well. All reagents were dissolved in 0·05 *M* phosphate buffer to give a total volume of fluid of 3 ml. For the cytochrome oxidase tests 0·3 ml of 4×10^{-4} *M* cytochrome *c* (*Evans*) was added. The laccase activity of the medium (extracellular laccase) was related to the amount of mycelium from which it had come.

Since the laccase preparation obtained from the intact mycelium had a $Q \cdot O_2$ of only 1·0 it is unlikely that laccase activity could account for the observed uptake of oxygen by the intact mycelium which had a $Q \cdot O_2$ (dry weight) varying from 15 to 28. Laccase preparations having a $Q \cdot O_2$ of 30 were obtained from the culture medium (cf. Fåhraeus[1]) but these could play no part in the respiration of the intact mycelium. On the other hand, cytochrome oxidase was present in sufficient quantity to account for the total observed oxygen uptake of the intact mycelium.

These experiments indicate that the electron transference to molecular oxygen is mediated in this fungus mainly, if not completely, by a cytochrome *c*-cytochrome oxidase system. Although small quantities of laccase are present in the mycelium and much larger quantities in the culture medium, it is unlikely that these act as terminal oxidases in the respiration of this fungus.

The writers wish to acknowledge financial assistance from the Nuffield Foundation.

D. Boulter and A. Burges

Department of Botany, University of Liverpool, December 6, 1954.

Zusammenfassung

Obgleich *Polystictus versicolor* reichlich Laccase bildet, zeigen die Ausfälle in respirationshemmenden Versuchen, dass die Cytochromoxydase die entscheidende Oxydase dieses Pilzes ist.

[1] G. Fåhraeus, Physiol. Plant. *5*, 284 (1952).

[1] D. Keilin and E. F. Hartree, Nature *164*, 254 (1949).
[2] G. Lindeberg and G. Holm, Physiol. Plant. *5*, 100 (1952).

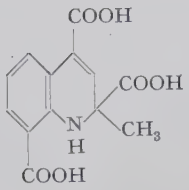
Über den Umsatz von Anthranilsäure mit Brenztraubensäure

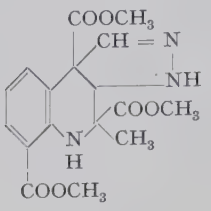
v. Euler[1] hat sich in mehreren Arbeiten mit den Umsetzungsprodukten von Verbindungen, die möglicherweise aus Buttergelb (p-Dimethylamino-azobenzol) in der Leber entstehen und den in der Leber nachgewiesenen Stoffwechselprodukten, wie etwa der Brenztraubensäure, eingehend befasst. Es wurden die Verbindungen, die aus Brenztraubensäure und p-Phenylendiamin[2], p-Aminophenol[2], den Aminobenzoesäuren[2], dem Sulfanilamid[3] usw. *in vitro* entstehen, beschrieben und ihr konstitutioneller Aufbau bewiesen.

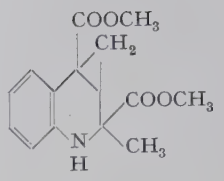
Für den Umsatz von Anthranilsäure (AS) mit Brenztraubensäure (BTS) haben v. Euler und Hasselquist[3] einen detaillierten Reaktionsmechanismus angeführt. Der entstehenden Verbindung der Bruttozusammensetzung $C_{13}H_{11}O_6N$, die antibiotisch und im Kressenwurzeltest wirksam ist, wurde die Konstitution I einer 1, 2-Dihydrochinaldin-2, 4, 8-tricarbonsäure zugeschrieben. Sie ist phototrop (gelb-grün) und gab bei der Chromsäureoxydation die Chinaldin-4, 8-dicarbonsäure VI bzw. bei der Destillation mit Eisenpulver Chinaldin. Diese Chinaldin-4, 8-dicarbonsäure sollte sich beim Liegen grün färben.

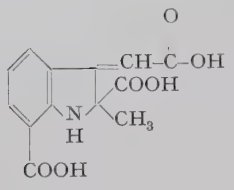
Beim Umsatz der Säure I mit Diazomethan entstand nach den Angaben der schwedischen Autoren die Verbindung $C_{17}H_{19}O_6N_3$, der die Konstitution II zukommen sollte. Durch Erhitzen dieser Verbindung über ihren

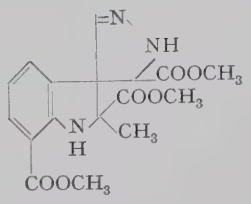
[1] H. v. Euler, Naturw. Rdsch. *4*, 133 (1953). In dieser Arbeit wurde scheinbar irrtümlich das Reaktionsprodukt aus AS und 2 Molen BTS zum Unterschied von der Originalarbeit als Chinaldin-4, 8-dicarbonsäure angeschrieben, während es dort als 1, 2-Dihydrochinaldin-2, 4, 8-tricarbonsäure formuliert worden war.
[2] H. v. Euler, H. Hasselquist und E. Eriksson, Ark. Kemi *5*, 251 (1953).
[3] H. v. Euler und H. Hasselquist, Ark. Kemi *5*, 193 (1953).

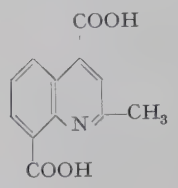

I

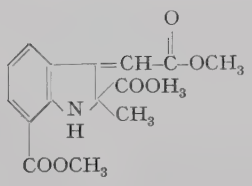

II

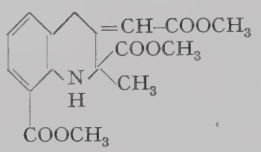

III

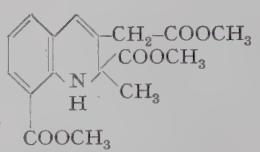

IV

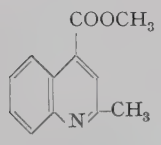

V

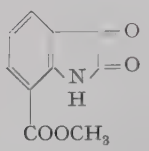

VI

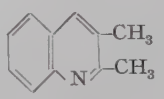

VII

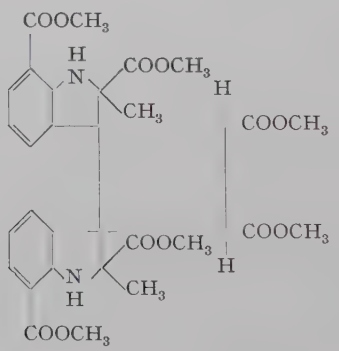

VIII


IX


X


XI


XII


XIII

Schmelzpunkt wurde Stickstoff abgespalten unter Bildung eines nichtkristallisierenden Öls der Zusammensetzung $C_{17}H_{19}O_6N$, für das die Konstitution III einer Trimethylenverbindung vorgeschlagen worden war.

Schon bei der Nacharbeitung dieser Versuche haben wir Ergebnisse erhalten, die mit der Konstitution I des Kondensationsproduktes aus AS und BTS nicht vereinbar sind. Aus äusseren Gründen veröffentlichen wir jetzt nur die Ergebnisse unserer Untersuchungen der Kondensation von AS und BTS.

Die hierbei erhaltene Tricarbonsäure ist trotz wiederholter Reinigungsoperationen verunreinigt, wie die durchgeführte Chromatographie an Aluminiumoxyd zeigte, worauf an anderer Stelle ausführlich eingegangen werden soll. Wir schlagen für dieses Kondensationsprodukt die Formel IV vor, da sie die folgenden experimentellen Befunde weitgehend zu erklären vermag. Unsere analytischen Daten bestätigen die von den schwedischen Autoren gefundenen. Die Säure IV kann mit 2-n-HNO_3 ohne Veränderung gekocht werden, was für ein 1,2-Dihydrochinolinderivat I sehr überraschend wäre. Erst nach Hinzufügen von konz. HNO_3 entsteht Chinaldin-4,8-dicarbonsäure VI; sie ist auch aus IV durch Chromsäureoxydation darstellbar. Die Dicarbonsäure VI stellt nach Reinigung eine *farblose* Substanz vom Smp. 310–312° (Euler und Hasselquist 294°, Grünverfär-

bung°) ohne jegliche Verfärbung dar. Bei der Bildung dieser Säure handelt es sich um eine Ringerweiterung, wofür in der Literatur[1] schon einige Beispiele vorliegen.

Für die Ringerweiterung sprachen die Zinkstaub- und Natronkalk-Destillation der Säure IV, die immer erhebliche Mengen Indolderivate lieferten, die durch starke Fichtenspan- und positive Ehrlichsche Reaktion erkannt wurden. Daneben entstand auch Chinaldin; weiter können die folgenden Befunde nur aus der Konstitution IV gedeutet werden.

Wird IV mit Diazomethan behandelt, so erhält man die Verbindung $C_{17}H_{19}O_6N_3$, der die Konstitution V eines spiranartig verknüpften Pyrazolins mit einem Indolin zukommen muss. Wird dieser Tricarbonsäureester V im Hochvakuum destilliert, so erhält man nach heftiger Gasentwicklung ein Öl, das wir zur Kristallisation gebracht haben. Diese Verbindung vom Smp. 87° besass die Zusammensetzung $C_{16}H_{17}O_6N$ und stellt den der Tricarbonsäure IV entsprechenden Trimethylester VII dar. Der Beweis hierfür ist die Tatsache, dass die Verbindung VII beim Versetzen mit CH_2N_2 in quantitativer Ausbeute wieder die Substanz V liefert.

Bei der Destillation von V entsteht neben dem Ester VII noch ein Öl, der Zusammensetzung $C_{17}H_{19}O_6N$. Für diesen Körper schlagen wir die Formeln VIII bzw. IX mit Vorbehalt vor, weil nur aus ihnen die Tatsache interpretierbar ist, dass das Öl nach Verseifung mit HCl und anschliessender Natronkalkdestillation ausschliesslich 2,3-Dimethylchinolin XII liefert. Eine Verbindung, nach III formuliert, wird einem solchen Reaktionsverhalten nicht gerecht. Die Bildung der Produkte der thermischen Zersetzung von V im Hochvakuum haben eine weitgehende Ähnlichkeit mit den in der Literatur[2] beschriebenen Reaktionen von α-Methylzimtsäure und Diazomethan.

Für das Vorliegen einer o-Aminozimtsäurestruktur gemäss IV bzw. VII sprachen auch UV.-spektroskopische Beobachtungen, die an anderer Stelle näher erläutert werden.

Die saure Hydrolyse von VII ergab nach Behandlung des Hydrolysats mit CH_2N_2 Chinaldin-4-carbonsäuremethylester X. Überraschenderweise entsteht dieser Körper nicht über die Chinaldin-4,8-dicarbonsäure VI, die bei der Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen völlig unverändert bleibt. Es kann also die dem Ester X entsprechende Säure nicht aus der Chinolinstruktur VI hervorgegangen sein. Einige weitere Nebenbefunde wollen wir in der demnächst erscheinenden ausführlichen Arbeit näher behandeln.

Ein wichtiger Befund für das Vorliegen eines Indolderivates in IV und VII konnte weiter durch die Ozonisierung des kristallisierten Trimethylesters VII erbracht werden; man erhielt hierbei Isatin-7-carbonsäuremethylester XI. Wenn über die durchlaufenen Stufen bis zur Isatinbildung nichts Genaues gesagt werden kann, so halten wir die Bildung von XI doch für strukturbeweisend. Eine weitere Stütze für unsere Formulierung stellt die Photodimerisation des Esters VII dar. Bei der Bestrahlung des Esters VII mit UV.-Licht fällt ein kristallisierter Körper der Zusammensetzung $C_{32}H_{34}O_{12}N_2$ (Smp. 232°) an, der im Hochvakuum nicht mehr flüchtig ist. In Analogie zu den Bestrahlungsprodukten der trans-Zimtsäure ist das Dimerisat voraussichtlich ein Cyclobutanderivat XIII mit α-Truxillsäurestruktur.

Alle aus der Tricarbonsäure IV durch die verschiedensten Reaktionen erhaltenen Chinolinderivate möchten wir nach diesen Befunden als Artefakte ansehen.

Herrn Dr. Otto Svierak möchte ich für seine Mitarbeit bestens danken.

K. Eiter

II. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, den 6. Januar 1955[1].

Summary

Using series of different reactions it has been possible to demonstrate that the tricarboxylic acid arising from anthranilic acid and pyruvic acid has not the constitution I but is correctly represented by IV. Several derivatives of this tricarboxylic acid were shown to have formulae that are in sharp contrast to those found in literature.

[1] E. Wenkert und Th. L. Reid, Exper. *10*, 417 (1954). – Th. Wieland, O. Weiburg, E. Fischer und G. Hörlein, Ann. Chem. *587*, 149 (1954). – P. L. Julian, H. C. Printy, R. Ketcham, R. Doone, J. Amer. Soc. *75*, 5305 (1953). – L. Horner, Ann. Chem. *548*, 117 (1941). – G. Jacini, Gaz. Chim. *73*, 85 (1943). – G. R. Clemo und H. Vipond, Chem. and Indust. *1949*, 856.

[2] K. v. Auwers und E. Cauer, Ann. Chem. *470*, 2956 (1929).

[1] Eine ausführliche, aber mit vorliegender Mitteilung inhaltlich identische Arbeit ging der Redaktion bereits am 21. Oktober 1954 zu.

Morphogenetic Effects of Centrifugation on the Isolated Ectoderm and Whole Embryo of Some Anurans[1]

In certain amphibians, a secondary tail is formed when the embryos are subjected to centrifugation[2]. Recently Pasteels[3] reported that in some species the secondary tail was produced at high frequency only when late blastulae or early gastrulae were centrifuged under proper conditions. The secondary tail thus formed contained spino-caudal structures, such as notochord, myotome and spinal cord, and was often completely separated from the primary axis. Furthermore Pasteels isolated the ectoderm, which was folded during the centrifugation of whole embryos, and cultured it *in vitro* or transplanted it to another embryo. Results were presented which indicated the differentiation of spino-caudal and other axial structures from this ectodermal piece. From these experiments, he suggested that the centrifugation can directly affect the presumptive ectoderm and initiate the axial differentiation in it[3]. In order to establish such a possibility, it seems necessary to make an experiment, in which the presumptive ectoderm is previously isolated and then centrifuged. Such experiments, carried out on the embryos of *Bufo vulgaris*, *Rana japonica* and *R. nigromaculata* are reported in this paper with some other related experiments.

[1] Supported by a grant from the Rockefeller Foundation, the Scientific Research Found of the Ministry of Education, and the Asahi Grant for Scientific Research.

[2] A. M. Benta and R. A. Gortner, J. exp. Zool. *18*, 433 (1915). – M. Bagini, Arch. ital. Anat. Embryol. *22*, 35 (1925). – P. Pasquini and G. Reverberi, Boll. Ist. Zool. R. Univ., Roma. *7*, 1 (1929). – H. W. Beams, R. L. King, and P. L. Risley, Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. *32*, 181 (1934). – I. Motomura, Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol. *10*, 211 (1935). – A. M. Schechtman, Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. *37*, 153 (1937). – J. Pasteels, Arch. Biol. Paris *51*, 355 (1940). – H. Ban, Zool. Mag. (in Japanese) *62*, 112 (1953).

[3] J. Pasteels, Exper. *3*, 30 and 73 (1947); Acta Anatomica *4*, 219 (1947); J. Cyto-embryol. belgo-neerland. Gand 88 (1949); J. Embryol. exp. Morph. *1*, 5 and 125 (1953).

I.–*The Conditions of Centrifugation Necessary for Obtaining the Secondary Tail in the Whole Embryo.* Some preliminary experiments were run in order to determine the stage and centrifugal force optimal for obtaining secondary structures by centrifugation. The temperature at the time of centrifugation was chosen according to that of the breeding season of each species used: 5°C for *Rana japonica*, 10°C for *Bufo vulgaris*, 20°C for *Rana nigromaculata*. The optimal centrifugal force was found to be between 350 and 400 g for *Bufo vulgaris*, and between 500 and 800 g for *Rana japonica* and *R. nigromaculata* for duration of 5 min.

Of all factors, the stage of centrifugation seems to be most important. The type of abnormality and site of secondary axis varied according to the stage of centrifugation. On centrifuging at the earliest stage of gastrulation, i.e. at the time of appearance of pigment in the future blastoporal area, well developed secondary tails were often formed from the medio-ventral region of the

Fig. 1.–A secondary tail produced by centrifugation of whole embryo of *Rana japonica*, located medio-ventrally in the trunk. Notochord, myotome, spinal cord, pronephros and mesenchyme are visible (about 40 ×).

embryo. Centrifugation at a little earlier or later stage gave rise to secondary structures located in the head region. On centrifuging still earlier, or still later, only head malformations were obtained but no secondary tails. When embryos were centrifuged still later, i.e. shortly after the beginning of actual invagination, neither secondary tail nor head malformation could be produced, and the subsequent development of the embryo was completely normal. Thus it is obvious that

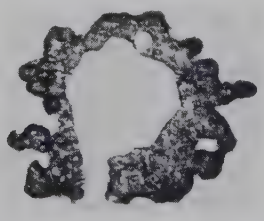


Fig. 2.–Centrifuged ectodermal explant of *Rana japonica*. Differentiation of epidermal cells (about 50 ×).

the reactivity of the embryo to form supernumerary structures under centrifugation is strictly limited to a short period of from one to two hours duration. In the embryo of *Rana japonica* and *Bufo vulgaris*, a well-defined secondary axis could be obtained in some instances at the frequency of 100%. According to histological examinations, the majority of the secondary axis contained spino-caudal structures, such as notochord, myotome, and spinal cord. Some of these were perfectly separated from the primary axis. In *Rana nigromaculata*, the frequency of double-tailed embryos was below 30% and the differentiation of the accessory tissues was not well advanced as in other species. In general, the results of this series of experiments confirmed the above cited data of Pasteels.

Fig. 3.–A secondary tail produced by centrifugation of whole embryo of *Bufo vulgaris*. A large notochord with myotome, spinal cord, and pronephros (about 40 ×).

II.–*Centrifugation of the Isolated Ectoderm.* The presumptive ectoderm was isolated from the latest blastula immediately before the appearance of the pigmented spot at the position of the future blastopore. Two isolated pieces were fused with their inner surfaces facing each other. Operation, centrifugation and culture were done in Holtfreter solution buffered at pH 7·0. The explants thus obtained were placed in a sealed tube and centrifuged under sterile conditions. As control, intact embryos from the same batch and of the same stage were centrifuged simultaneously with the explants.

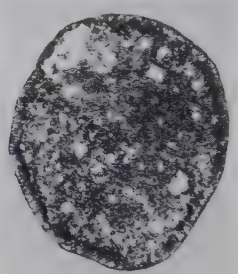


Fig. 4.–Centrifuged ectodermal explant of *Bufo vulgaris*. Epidermal cells and sucker cells (about 40 ×).

The conditions established in series I were followed as strictly as possible. It was observed that the explants were remarkably flattened by centrifugal force, but were never folded as in the case of the whole embryo (see above). The explants were cultured for from 7 to 9 days at 20°C and studied in sections. As shown in Table I, the centrifuged, isolated ectoderm of *Bufo vulgaris* and *Rana japonica* differentiated the epidermis and occasionally the sucker cells, but it did not show any mesodermal or neural differentiation and could not be distinguished from the untreated ectodermal explants either by histological or external observations. That the isolate of the presumptive ectoderm of anuran gastrula differentiates sucker cells was well established by earlier experiments[1]. The centrifuged whole embryos of the

[1] T. Yamada, J. Facul. Sci., Tokyo Imp. Univ. *3*, 239 (1933). – J. Holtfreter, Roux' Arch. *129*, 669 (1933). – T. Yamada, J. Facul. Sci., Tokyo Imp. Univ. *5*, 133 (1938). – L. Raunich, Monitore Zool. Ital. *8*, 11 (1942).

Table I.–Effects of centrifugation of isolated ectoderm and whole embryo

Species	Batch	Stage*	Centrifugal force** g	Centrifuged explant		Centrifuged whole embryo				
				Usable cases	Neural or mesodermal tissues	Usable cases	Secondary tail	Head malformation	Subnormal	Normal
Bufo vulgaris	A-1	I	400	14	0	22	19	1	2	0
	B-1	I	350	10	0	21	17	2	2	0
	B-2	I	500	7	0	18	12	4	2	0
	C-1	0	350	9	0	22	12	3	5	2
	C-2	0	1800	9	0	—	—	—	—	—
				49	0	83	60	10	11	2
Rana japonica . . .	A-1	II	500	9	0	30	9	12	7	2
	A-2	II	800	7	0	25	7	12	4	2
	B-1	I	800	8	0	27	1	0	4	22
	C-1	I	800	4	0	41	11	11	10	9
	C-2	I	500	8	0	38	2	3	23	10
				36	0	162	30	38	48	45

* Stage 0: The latest blastula immediately before the onset of gastrulation. Stage I: The earliest gastrula at the moment of appearance of the pigmented spot in the blastoporal region. Stage II: The succeeding stage with the small pigmented patch.
** The length of time of centrifugation is 5 min respectively.

control series differentiated the secondary axis at a frequency higher in *Bufo vulgaris* (60 out of 83 cases) than in *Rana japonica* (30 out of 161 cases). In *Rana nigromaculata* (data not shown in the table), the isolated ectoderm was centrifuged at 250 to 2000 g. Differentiation of epidermis and sucker cells but no other tissue was observed in 105 thus treated explants. However, as the frequency of the secondary axis formation in the simultaneously centrifuged whole embryo of the control series was very low, this negative result was not as convincing as those of experiments on *Bufo vulgaris* and *Rana japonica.*

The results of series II considered together, do not support the idea of direct activation of the presumptive ectoderm by the centrifugal force, previously mentioned.

III.–*Subcytolytic Treatment of the Presumptive Ectoderm.* A close similarity of the basic mechanism of the subcytolytic neutralization of the ectoderm isolate and that of the secondary axis formation by centrifugation was suggested by PASTEELS[1]. However, the published experiments[1] of subcytolytic neuralization were limited to *Triturus*, which is known to be non-reactive toward centrifugation. Furthermore, this subcytolytic treatment was found to lead to the formation of unorganized neural tissue and archencephalic structures such as brain, eye, nose and mesenchyme, but not to the formation of spino-caudal structures such as notocord, somites, and spinal cord, which are encountered in our secondary axis[2]. For this reason, it is worth-while to investigate the morphogenetic effect of subcytolytic stimulus on the ectoderm of the amphibians, whose embryos are known to react to centrifugation.

The presumptive ectoderm of early gastrula of *Rana nigromaculata* was isolated and exposed to a solution of ammonia (pH 12·0). Out of 41 aggregates thus obtained, 16 differentiated the mesenchyme and neural tissue. The other structures differentiated were epidermis and sucker cells, both of which occurred also in the control

[1] J. PASTEELS, Exper. *3*, 30 and 73 (1947); J. Cyto-embryol. belgo-neerland. Gand 88 (1949); J. Embryol. exp. Morph. *1*, 5 and 125 (1953).

[1] J. HOLTFRETER, J. exp. Zool. *98*, 161 (1945). – T. YAMADA, Biol. Bull. *98*, 98 (1950 a).

[2] By subcytolytic treatment, myotomes and notochord were obtained in the isolate from the ventral marginal zone of *Triturus*-gastrula, which without the treatment differentiated the blood island, mesothelium and pronephric tubules (YAMADA, 1950a).

Table II.–Histological observation of abnormality of *Bufo vulgaris* caused by centrifugation (cultured for 6 days at 20°C)

Batch	Centrifuged embryo	Usable cases	Abnormality of primary axis			Histological constitution of secondary axis										
			Malformation of brain	Chordarization of brain	Malformation of notoch.	Otic vesicle	Brain	Neural tube	Notochord	Myotome	Pronephros	Mesenchyme	Blood cells	Fin	Sucker	Gut
A-1	24	22	3	0	0	2	7	13	3	13	1	19	4	4	1	2
B-1	26	21	8	2	3	1	5	8	7	8	1	15	5	1	1	2
B-2	30	18	10	3	3	2	7	9	7	9	0	12	10	3	2	3
C-1	25	22	7	3	0	4	5	8	8	9	1	11	4	2	1	4
	105	83	28	8	6	9	24	38	25	39	3	57	23	10	5	11

series. In another series[1], the presumptive ectoderm of early gastrula of *Rana pipiens* was isolated and treated with 0·2 M borate buffer at pH 9·3 for 6–12 min. One hundred and sixty-six isolates thus treated were allowed to reaggregate into 20 larger explants, and cultured at 18°C for 4 to 8 days. Eighteen pieces of such aggregates could be studied in sections, and 23 neural structures were recognized, of which 7 were classified into the brain-type and 2 into the nose-type[2], while others were unorganized neural fragments. All aggregates contained extensive groups of sucker cells as well as epidermis and neural cells. Without close comparative study, the large vacuoles of sucker cells could have been mistaken for notochord vacuoles.

The results of this series do not support the assumption that the secondary axial system in question is caused by a mechanism similar to subcytolytic stimulation of the isolated ectoderm, by showing that the latter causes only archencephalic type or unorganized neural differentiation, and not the spino-caudal type encountered in the secondary axis produced by centrifugation.

The data presented here seem to throw doubt on the assumption that a simple, direct activation of individual cells of the presumptive epidermis by centrifugation is the cause of the formation of a secondary axis. However, the possibilities are not excluded that the centrifugal force affects the presumptive ectoderm directly when it is within the whole intact embryo, perhaps by changing its relationship with other components of the embryo.

S. Karasaki and T. Yamada

Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan, November 15, 1954.

Zusammenfassung

Zentrifugierung der Froschkeime gerade vor oder am ersten Anfang der Gastrulation bringt bekanntlich ein sekundäres axiales System an der ventralen oder lateralen Flanke der Embryonen hervor. Um die Annahme zu prüfen, dass diese spino-kaudalen Gebilde aus dem präsumptiven Ektoderm durch eine direkte Wirkung der Zentrifugierung hervorgehen, wurde isoliertes, präsumptives Ektoderm unter den genau kontrollierten Bedingungen zentrifugiert und gezüchtet. Die Isolate differenzierten Epidermis und Haftdrüsenzellen, aber kein axiales Gewebe. Subzytolytische Behandlung des isolierten, präsumptiven Ektoderms der jungen Gastrulae brachte unorganisierte Neuralgewebe oder archenkephale Gebilde, aber kein spino-kaudales Gewebe hervor. Also gaben die beiden Versuchsreihen keine Unterstützung für die oben genannte Annahme.

[1] The experiment was performed at the Institute for Cancer Research and Lankenau Hospital Research Institute in Philadelphia, by one of the writers, Yamada, when he was there as a guest investigator. He expresses his sincere thanks to Dr. R. Briggs and other members of the Institute for their kind help.

[2] T. Yamada, Embryologia *1*, 1 (1950b).

On Phosphorylation in Brain Tissue in the Chick

Experiments in the literature relate P_{32} exchange in tissue to the biosynthesis of adenosine triphosphate, a recent report by Krebs[1] presents an approach which differs from those previously employed. In his experiments use is made of sufficiently large quantities of adenosinetriphosphate and inorganic phosphate as a carrier for the label that any fate of the isotope beyond that of its exchange with the adenosine phosphates is negligible in the dilute enzyme system employed. In addition, the organic phosphates are separated by paper chromatography in order that the fate of the label within this system can be well ascertained. However, Slater and Holton[2] believe that the kinetic treatment of Krebs was over simplified. Their criticism was based on an argument involving the system:

$$(1)\quad \text{Alpha-Kg} + \text{CoA} + \text{DPN}^+ \xrightarrow{k_1} \text{Succinyl-CoA} + \text{DPNH} + \text{H}^+.$$

$$(2)\quad \text{Succinyl-CoA} + \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4 \underset{k_3}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} \text{Succinate} + \text{CoA} + \text{ATP}.$$

Essentially, if k_2 and k_3 are large with respect to k_1, then exchange of ATP with inorganic phosphate will not measure ATP synthesis. Although the technique might not be sufficiently critical in experiments designed to search for errors in P/O ratios, we believed that such an approach could be suitable to compare tissues with respect to P_{32} exchange. Reported below is an application of the above experimental design in its simplest aspects. P_{32} exchange was examined in liver and brain homogenates from these tissues of the chick embryo.

Three 17 day chick embryos and a day old hatched chick were used for each experiment. The brain and liver were rapidly removed, weighed and placed in beakers containing ice cold saline. These beakers were stored for fifteen minutes at freezing temperatures, homogenized, and sufficient saline was mixed with the homogenate so that for each gm of tissue there would be 20 ml of saline. 4 ml each of liver and brain suspensions were incubated with 12 mg of commercially prepared ATP and 0·2 ml of P_{32} as KH_2PO_4 in a Dubnoff metabolic shaker. At the end of the times indicated below (Table) 1 ml of the enzyme suspension was removed from the beaker, placed into a 15 ml conical centrifuge tube, and the enzyme activity was stopped by adding 0·2 ml of 30% trichloracetic acid. The centrifuge tubes were placed in an ice bath and centrifuged at 5° for 15 min. The supernatant solutions were frozen and stored for the chromatographic separation of the labeled components. When the chromatograms were complete, the paper was cut into one-fourth inch strips after being numbered consecutively, so that the strip having the number one was nearest the origin, and the strip having the highest number was nearest the solvent front. Each strip was then measured for radioactivity using a Geiger tube with an efficiency of approximately 2%. After this measurement each strip was placed in a test tube, 5 ml of water were added, and the optical density at 260 mμ was recorded using the Beckman Model DU spectrophotometer.

[1] H. A. Krebs, A. Ruffo, M. Johnson, L. V. Eggleston, and R. Hems, Biochem. J. *54*, 107 (1953).

[2] E. C. Slater and F. A. Holton, Biochem. J. *56*, 28 (1954).

[3] L. V. Eggleston and R. Hems, Biochem. J. *52*, 156 (1952).

Activity of Adenosinetriphosphate Following the Incubation of Liver and Brain Homogenates with $KH_2P_{32}O_4$

Source of Homogenate	Time of Incubation	Optical Density[1] at 260 mμ	Counts per Minute[2]	Cts/min Optical Density Units
Liver (Embryo)	2	0·74	202	273
	5	0·66	260	394
	10	0·75	229	305
	20	0·55	180	337
Brain (Embryo)	2	0·74	122	155
	5	0·72	107	149
	10	0·53	122	230
	20	0·64	92	144
Liver (Hatched Chick)	2	0·50	282	564
	5	0·55	303	551
	10	0·50	207	414
	20	0·23	127	540
Brain (Hatched Chick)	2	0·96	111	116
	5	0·94	108	115
	10	0·99	110	111
	20	0·70	102	146

[1] This measurement represents the absorbance of the leached one-fourth inch strip (see text) from the chromatogram.

[2] Following this measurement of radioactivity on the strip, the solute was leached from the strip in order to measure absorbance.

The data expressed, employing a specific activity function, i.e. counts/min/optical density unit, appear in the table. In all cases the specific activity of the ATP is less in brain than in liver. On the basis of the two groups of experiments shown, the difference between the rate of exchange in brain and in liver appears to be greater in the hatched chick than in the embryo incubated for 17 days. Should subsequent experiments support these findings, it seems that this would be of interest in view of recent differences between the hatched chick[1], and the embryo[2], with respect to carboxylations involving certain acids of the Krebs cycle.

O. M. Gordon, K. O. Donaldson, and L. M. Marshall

College of Medicine, Howard University, Washington, January 15, 1955.

Zusammenfassung

Der Austausch von P^{32} zwischen anorganischem Phosphat und ATP war grösser in der Leber als im Gehirn des Hühnchens. Dieser Unterschied in den zwei Geweben ist jedoch nach dem Ausbrüten des Embryos grösser.

[1] L. H. Newmann, K. O. Donaldson, and L. M. Marshall, Amer. J. Physiol. *178*, 97 (1954).

[2] L. M. Marshall, K. O. Donaldson, L. H. Newman, and M. H. Kahn, J. Biol. Chem. *209*, 697 (1954).

Propriétés chitinolytiques du liquide exuvial du ver à soie (*Bombyx mori* L.)

Lorsqu'on ligature des vers à soie au dernier âge larvaire, entre la tête et le thorax, 48 h après la dernière défécation, on obtient des nymphes non dépouillées de leur exuvie larvaire et qui n'ont pu déglutir leur liquide exuvial (*moulting fluid*). Dans quelques cas, ce liquide s'accumule rapidement dans la région thoracique entre le tégument nymphal et l'exuvie larvaire: en incisant cette exuvie, le liquide sous-jacent jaillit spontanément; il est jaune clair, transparent, mais noircit rapidement au contact de l'air (type I). Plus fréquemment, le liquide exuvial s'accumule lentement dans la région thoracique et noircit au fur et à mesure de son émission (type II). Le prélèvement, réalisé de la même manière que dans le cas précédent, mais plus tardivement, est particulièrement délicat: en effet, le tégument nymphal est fragilisé par la macération dans le liquide exuvial et l'on doit éviter avec soin toute manipulation brusque de la nymphe qui pourrait provoquer des déchirures du tégument et un écoulement de sang.

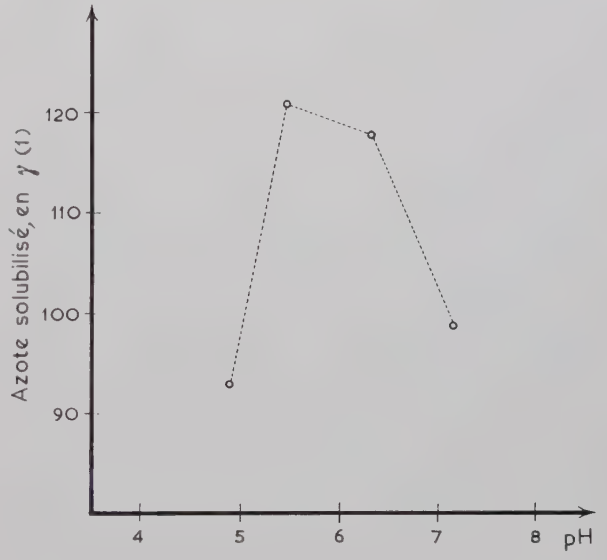


Fig. 1. Activité chitinolytique du liquide exuvial à différents pH. (1): différence entre l'azote-chitine du témoin sans enzyme (139 γ) et l'azote-chitine de chaque test, après 6 h d'incubation.

Conditions expérimentales: 4 ml de liquide exuvial dilué au 1/6; 1 ml de tampon citrate-NaOH 0,6 *M*; 1 ml de suspension de chitine pulvérisée (2,3 mg/ml), à 35° C, en présence de thymol.

Nous avons recherché la présence de chitinase dans le liquide exuvial, par dosage de l'azote-chitine restant après incubation d'une suspension de chitine pure en présence d'une solution de liquide exuvial[1].

Un premier lot de 4 chenilles ligaturées, correspondant au type I décrit ci-dessus, a fourni 4 ml de liquide exuvial. Après dilution au 1/6 par de l'eau bidistillée et centrifugation, on teste l'activité chitinolytique du liquide surnageant. 4 ml de cette solution (soit 0,66 ml de liquide exuvial brut) solubilisent 2,3 mg de chitine, en 14 h d'incubation à 37° C et à pH 6,9. Une station de 2 h à 70° C inactive complètement la chitinase.

Un second lot de 12 chenilles ligaturées, correspondant au type II décrit ci-dessus, permet de recueillir 3,1 ml

[1] Ch. Jeuniaux, Arch. int. Physiol. *59*, 242 (1951).

de liquide exuvial. Après dilution au 1/6 et centrifugation, les propriétés chitinolytiques de cette solution sont testées à différents pH (en tampon citrate-NaOH, conc. finale 0,1 *M*) (Fig.).

La cinétique de l'action chitinolytique du liquide exuvial est semblable à celle des autres chitinases connues (liquide intestinal de l'Escargot[1], exochitinase d'un Actinomycète isolé du sol[2]), qui manifestent également une activité optimale entre les pH 4,8 et 5,4. Par contre, nos résultats diffèrent nettement de ceux obtenus par Hamamura et al.[3] avec un extrait aqueux d'exuvies larvaires de *Bombyx mori;* le pH optimum pour la chitinase de cet extrait serait de 8,2, tandis que l'activité serait particulièrement faible au dessous du pH 6.

Nos observations confirment la présence d'une chitinase intervenant au cours du phénomène de la mue, hypothèse formulée notamment par Wigglesworth[4]. La dissolution enzymatique de la chitine de l'endocuticule au moment de la mue avait été montrée par Renaud[5] pour *Maia squinado* et par Passonneau et Williams[6] pour *Platysamia cecropia.*

Ch. Jeuniaux[7] et M. Amanieu

Laboratoires de Biochimie, Université de Liège, et Laboratoire de Biologie animale, Faculté des Sciences de Bordeaux, le 15 janvier 1955.

Summary

The authors add further confirmation to the hypothesis of the role played by a chitinase during the process of moulting. By ligaturing *Bombyx mori*-larvae between head and thorax, accumulation of moulting fluid takes place between the larval and nymphal cuticles, swallowing of this fluid being prevented. The chitinolytic properties of this moulting fluid are demonstrated *in vitro.* The activity of chitinase at different pH is investigated: the optimum pH lying at about 5·4.

[1] P. Karrer et A. Hofmann, Helv. chim. Acta *12*, 616 (1929). – R. H. Hackmann, Austr. J. Biol. Sci. *7*, 168 (1954).

[2] Ch. Jeuniaux, Arch. int. Physiol. *59*, 242 (1951); Mém. Acad. roy. Belg., Classe sci. *28*, fasc. *7* (1954).

[3] Y. Hamamura et Y. Kanehara, J. Agr. Chem. Soc. Japan *16*, 907 (1949). – Y. Hamamura, S. Iida, M. Otsuka, Y. Kanehara et S. Ito, Bull. Faculty Text. Fibers, Kyoto University, *1*, 127 (1954).

[4] V. B. Wigglesworth, Quart. J. Micr. Sci. *76*, 269 (1933); Biol. Rev. *23*, 408 (1948).

[5] L. Renaud, Ann. Instit. Océanogr. *24*, 259 (1949).

[6] J. V. Passonneau et C. M. Williams, J. Exper. Biol. *30*, 545 (1953).

[7] Aspirant du F.N.R.S.

On the Metabolic Significance of Blood Pyruvate in B_1 Avitaminosis

The researches of Peters and coworkers[1] on the biochemical significance of Aneurin (cocarboxilase) have achieved a firmly established step forward in our knowledge of the mechanism of cellular oxidation. In consequence of their work it has been generally accepted that the hyperpyruvicaemia which occurs during B_1 avitaminosis is the direct expression of the delayed or interrupted oxidation of pyruvate. This opinion is supported by the *Catatorulin Effect in vitro* which was demonstrated by Peters and coworkers. This phenomenon, which has been especially studied on the pigeons brain, is obtained only when the vitamin content of the tissue (*nervous*) has reached very low values. An analogous result[1] has recently been observed in the living organism of the rat in B_1 avitaminosis with regard to the metabolic response (*increase* of the R.Q. and heat production) after the administration of 1 g of glucose *per os*. This result is not obtained if the Vitamin B_1 content of the tissues is very low.

Since the vitamin B_1 content in the nervous tissue decreases more slowly than in other tissues[2], reaching values of about 0·5 μg per g only in very advanced stages of avitaminosis, it can be presumed that only in this stage, when there is a catatorulin effect *in vitro* and lack of a metabolic response *in vivo* to the administration of glucose, is the oxidative mechanism of the pyruvate sensibly altered (slowed or interrupted).

On the other hand, the blood pyruvate in the rat begins to increase after only 2 weeks of avitaminosis and the increase continues with increasing rapidity for another 2 weeks period during which the animal responds to the administration of glucose *per os* with an increase in the R.Q. and caloric production[3]. It does not seem probable in this period, in which the animal utilizes glucides in the same manner as the controls, that the alteration of the oxidation of pyruvate is such as to justify the already conspicuous increase in blood pyruvate.

The researches of Deane and Shaw[4] and of Skelton[5] have shown that the major part of the changes in the organs that result from B_1 avitaminosis in the rat (hypertrophy of the adrenals, involution of the thymus gland, renal hypertrophy, diminution of the ascorbic acid content of the adrenals, diminished secretion of gonadotropin and increased secretion of corticotropin by the prehypophysis) can be interpreted as a manifestation of the general syndrome of adaptation (Selye). This syndrome is maintained by a hyperactivation of the hypophysis–adrenal system, as a consequence of fasting and the lack of vitamin B_1 in the diet. We are dealing therefore with aspecific symptoms, which are in common with other avitaminosis (B complex, pantothenic acid). Of all these alterations the most important is without doubt the hypertrophy of the adrenals, which was well demonstrated several years ago by Mc Carrison[6].

Recent researches by Rindi, Ferrari, and Perri[7] have showed that the accumulation of pyruvate in the blood (rat) can be correlated statistically with the adrenal hypertrophy rather than with the values of the Vitamin B_1 content in the tissues.

To control experimentally whether and to what extent, the hypophysis-adrenal system influences the pyruvicaemia in B_1 avitaminosis, we followed the pyruvate variations in hypophysectomized and adrenalectomized rats. In the first case, 5 days after hypophysectomy

[1] N. Gavrilescu and R. A. Peters, Biochem. J. *25*, 1397 (1931). – R. Passmore, R. A. Peters, and H. M. Sinclair, Biochem. J. *27*, 842 (1933). – R. A. Peters and R. H. S. Thompson, Biochem. J. *28*, 909 (1934). – S. Ochoa and R. A. Peters, Biochem. J. *32*, 1501 (1938). – R. A. Peters, Farmaco *4*, 558 (1949).

[1] L. de Caro, G. Rindi, and E. Grana, Exper. *10*, 140 (1954).

[2] S. Ochoa, *The Biological Action of the Vitamins* (Chicago, 1944), pag. 27. – J. Salcedo Jr., V. A. Najjar, L. E. Holt Jr., and E. W. Hulzler, J. Nutr. *36*, 307 (1948).

[3] L. de Caro, C. Casella, and G. Rindi, Exper. *8*, 431 (1952).

[4] H. W. Deane and I. H. Shaw, J. Nutr. *34*, 1 (1947).

[5] F. R. Skelton, Amer. J. Physiol. *161*, 515 (1950); Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *73*, 516 (1950).

[6] R. Mc Carrison, Indian J. Med. Research *6*, 275 (1919).

[7] G. Rindi, G. Ferrari, and V. Perri, Inter. Z. Vitaminforschg. *25*, 210 (1954).

the rats (100 g) were brought to a state of avitaminosis with the method previously described[1]. They were able to withstand the avitaminosis very well for more than 30–35 days. In the case of the adrenalectomized rats, with a shorter survival period, we had to use a different procedure: the rats were adrenalectomized at different phases of the avitaminosis and were then sacrificed 4–6 days after adrenalectomy.

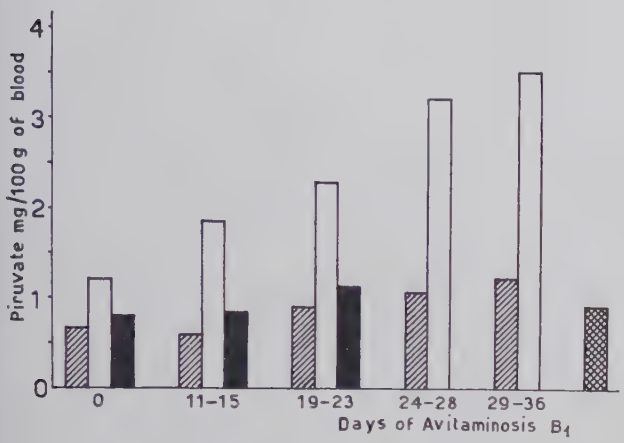


Fig. 1.–Blood Pyruvate of rats in Avitaminosis B_1: not operated, hypophysectomized and adrenalectomized.

Not operated rats in Avitaminosis B_1 (controls)

Hypophysectomized rats in Avitaminosis B_1

Adrenalectomized rats in Avitaminosis B_1

Hypophysectomized rats after 38 days (controls)

The results are shown synthetically in Figure 1. They show that in the hypophysectomized rats there is a B_1 avitaminosis hypopyruvicaemia and that adrenalectomy performed on rats in avitaminosis always causes a marked lowering of the pyruvicaemia. The course of the avitaminosis was followed by determining the Aneurin content of the tissues (brain, muscle, liver), which does not differ substantially from that of the controls. Even in normal rats hypophysectomy and adrenalectomy lower the pyruvate content of the blood.

Complete data will be published elsewhere[2].

From these results and from what is known on the increase of the pyruvicaemia in states of stress[3], or following the injection of cortisone or adrenal extracts in experimental animals[4], one might conclude that in B_1 avitaminosis the accumulation of pyruvate in the blood may be considered to a certain degree as due to the hyperfunction of the hypophysis-adrenal system.

These results do not exclude the possibility that part of the pyruvate that accumulates in the blood may be derived from a retarded or blocked oxidation of the pyruvate; but we have stated above the consideration that lead us to believe that the interruption or slowing down of the oxidative mechanism comes into play in the advanced stages of avitaminosis. The hyperpyruvicaemia which accompanies the B_1 avitaminosis is therefore a consequence of both hyperformation due to adrenal hyperfunction and to a slowed process of removal of the pyruvate, that is, it is in part an aspecific metabolic symptom, in part a specific symptom of the avitaminosis.

This interpretation permits us to explain a fact that would otherwise be difficult to explain: that is, the normal utilization of glucides by rats in avitaminosis from 3–4 weeks, when the blood pyruvate is already markedly increased[1].

L. de Caro and G. Rindi

Institute of Human Physiology, University of Pavia, December 23, 1954.

Riassunto

L'iperpiruvicemia che accompagna l'avitaminosi B_1 (ratto) è da considerarsi come dovuta, almeno in parte, all'iperfunzione del sistema ipofisi-surrene.

[1] L. de Caro, C. Casella, and G. Rindi, Exper. *8*, 431 (1952). – G. Rindi, G. Ferrari, and V. Perri, Inter. Z. Vitaminforschg. *25*, 210 (1954).

[2] L. de Caro, G. Rindi, G. Ferrari, and V. Perri, Arch. Sci. Biol.

[3] H. Selye, Stress, Acta In. Montreal *1950*, 137.

[4] G. Ferrari, Boll. Soc. it. Biol. sper. *29*, 798 (1953).

Freisetzung von Kalium aus denerviertem und innerviertem Skelettmuskel durch Acetylcholin

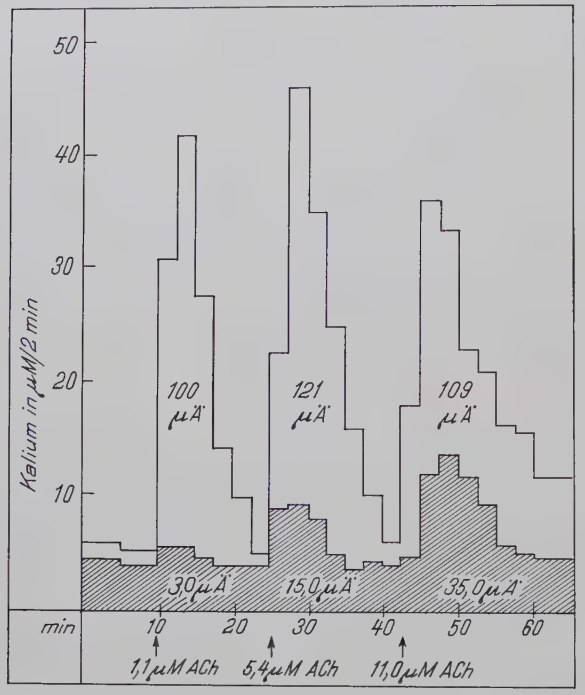
In einer vorangegangenen Mitteilung konnten wir zeigen, dass nach intravenöser Verabreichung einer Reihe von neuromuskulär wirksamen quartären Ammoniumverbindungen (Succinylbischolin, Dekamethonium und Octamethylenbiscarbaminoylcholin), die eine Depolarisation der Endplattenregion bewirken, Kaliumionen aus der Muskulatur in die Extrazellularflüssigkeit in Freiheit gesetzt werden[1]. Die nachstehend mitgeteilten Versuche sollen zeigen, unter welchen Bedingungen und in welcher Grössenordnung eine Freisetzung von Kalium aus der Skelettmuskulatur durch Acetylcholin (ACh) erfolgt bzw. wie sich die Empfindlichkeitssteigerung des chronisch denervierten Muskels für ACh in dieser Hinsicht auswirkt.

Die Versuche wurden an Katzen mit isolierter Durchströmung beider hinterer Extremitäten in der gleichen Versuchsanordnung wie bei Klupp und Kraupp[1] beschrieben ausgeführt. Eine der beiden Extremitäten wurde dabei jeweils 8 bis 12 Tage vor dem Versuche durch Durchschneidung der N. ischiadicus und femoralis denerviert. Die durchströmten Extremitäten waren in einem Wasserbad von konstanter Temperatur von 37° versenkt. Als Durchströmungsflüssigkeit wurde eine Blut-Tyrode-Verdünnung (durchschnittliche Sauerstoffkapazität: 3,5 Vol%) verwendet. Die Kaliumbestimmungen wurden flammenphotometrisch durchgeführt.

Ergebnisse. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass bei Durchflussgrössen von 10 bis 30 cm^3 je Minute und Extremität die spontane Abgabe von Kalium an die Durchströmungsflüssigkeit den geringen Wert von 1 bis 2 μg/min auf der innervierten und von 2 bis 4 μg auf der denervierten Seite beträgt. In diesem Durchflussbereich blieb die arteriovenöse Konzentrationsdifferenz des Kaliums innerhalb des Versuches praktisch konstant, so dass die aus der Muskulatur an die Durchströmungsflüssigkeit abgegebenen Kaliummengen der Durchfluss-

[1] H. Klupp, O. Kraupp, Arch. Int. Pharmacodyn *98*, 340 (1954).

grösse proportional waren. Dadurch war es möglich, die durch ACh zusätzlich in Freiheit gesetzten Kaliummengen nach Abzug der der jeweiligen Durchflussgrösse entsprechenden Spontanfreisetzung zu bestimmen. In den Ergebnissen der Tabelle sind nur solche Versuche berücksichtigt, bei denen diese Bedingungen erfüllt waren. Grösse und zeitliche Verhältnisse der Kaliumfreisetzung nach intra-artieller ACh Verabreichung sind aus der Abbildung an Hand eines unserer Versuche ersichtlich.



Katze, 3 kg, Chloralosenarkose (80 mg/kg). Kaliumfreisetzung an der innervierten und denervierten Extremität. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Kaliumabgabe der Muskulatur in µM je 2 min; bei ↑ intraarterielle Injektion von ACh. Die Durchflussgeschwindigkeit war in diesem Versuch für beide Extremitäten gleich. Die angegebenen ACh-Dosen gelten für innervierte und denervierte Extremität und geben die tatsächlich je Extremität zugeführte ACh-Menge an. Ausgefüllte Felder: innervierte Extremität; leer umrandete Felder: denervierte Extremität.

Die aus einer Reihe solcher Versuche bestimmten Absolutwerte der zusätzlichen Kaliumausschüttung nach verschiedenen Dosen von ACh sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Zusatz von *d-Tubocurarin* (dTC) in einer molaren Konzentration von 10^{-5} zur Durchströmungsflüssigkeit führte am innervierten Muskel zu einer völligen Unterdrückung der Kaliumausschüttung selbst bis zu einer Dosis von 53 µM ACh. Am denervierten Muskel wurde die Kaliumausschüttung bei Durchströmung mit 10^{-5} dTC in einem Dosenbereich von 0,52 bis 10,5 µM ACh auf durchschnittlich 12% der Werte ohne dTC herabgesetzt.

Unter *Eserin* (molare Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit: 10^{-7}) wurde die Kaliumausschüttung an der innervierten Extremität nach Dosen von 0,95 bis 1,20 µM ACh auf das 5- bis 6fache, an der denervierten Extremität im selben Dosenbereich von ACh hingegen nur um rund 20% gesteigert.

Weitere Versuche ergaben, dass die Unterschiede in der Kaliumfreisetzung zwischen innervierter und denervierter Extremität verschwinden, wenn nur ein dreitägiges Intervall zwischen Denervierung und Versuchen eingehalten wurde.

Besprechung der Versuchsergebnisse. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass in dem untersuchten Dosenbereich die Beziehung zwischen ACh-Dosis und -Menge an freigesetztem Kalium für den denervierten und innervierten Muskel weitgehend verschieden ist. Neben dem grossen Unterschied in den Schwellendosen (0,84 µM innervierte Extremität, 0,01 µM denervierte Extremität) fällt vor allem die starke Abhängigkeit der molaren Relation ACh-Dosis zu freigesetztem Kalium an der denervierten Extremität ins Auge, während dieses Verhältnis an der innervierten Extremität über mehr als eine Zehnerpotenz der ACh-Dosen eine vergleichsweise sehr geringfügige Abnahme mit Erhöhung der ACh-Dosis zeigt. Was nun den anatomischen Ort des Kaliumaustrittes anbetrifft, so muss hier in erster Linie an die Endplattenregion gedacht werden, da diese am innervierten[1] und denervierten Muskel[2] um vieles empfindlicher für die depolarisierenden Wirkungen des ACh als die Muskelmembran ist. Hiefür spricht auch die Tatsache, dass die von uns beobachtete Kaliumfreisetzung durch dTC weitgehend unterdrückt werden konnte. Unter der Annahme einer Gesamtzahl von 10^6 Endplatten je Extremität[3] ist nach den Ergebnissen der Untersuchungen von Fatt und Katz[4] und Acheson[5] bei maximaler Depolarisation durch ACh ein Gesamt-

[1] S. W. Kuffler, J. Neurophysiol. *6*, 99 (1943).
[2] J. G. Nichols, J. Physiol. *123*, 2P (1954).
[3] J. C. Eccels, *The neurophysiological Basis of Mind* (Clarendon press, Oxford 1953), S. 78.
[4] P. Fatt und B. Katz, J. Physiol. *115*, 320 (1951).
[5] G. H. Acheson, Fed. Proc. *7*, 447 (1948).

Innerviertes Bein			Denerviertes Bein		
ACh Dosis in µM	Kalium in µM	molares Verhältnis ACh: Kalium	ACh Dosis in µM	Kalium in µM	molares Verhältnis ACh: Kalium
0,024	0	–	0,020	14,6	1:730
0,053	0	–	0,035	25,9	1:740
0,115	0	–	0,106	49,2	1:464
0,244	0	–	0,199	50,3	1:252
0,580	0	–	0,520	76,1	1:146
0,840	3,4	1:4,00	1,37	97,6	1: 71
3,90	11,5	1:2,95	5,52	130,0	1: 23
5,52	17,0	1:3,00	6,45	108,0	1: 16
11,35	29,2	1:2,56	10,70	143,2	1: 13
18,20	39,1	1:2,15	13,45	114,6	1: 8

ionenstrom von $3 \cdot 10^{-8}$ Mol je m/s durch sämtliche Endplatten einer Extremität zu erwarten. Wenn wir ein Drittel dieses Ionenstromes dem Kalium zuordnen und berücksichtigen, dass die Dauer der Endplattendepolarisation nach intraarterieller Injektion von 25 bis 50 μg ACh am Musculus gracilis der Katze mehrere Sekunden beträgt[1], so liegt der daraufhin zu erwartende Kaliumaustritt in der Grössenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5} Mol und stimmt mit der von uns am denervierten Muskel experimentell bestimmten Kaliumfreisetzung gut überein. Die weitgehend lineare Abhängigkeit der Kaliumausschüttung von der ACh-Dosis am innervierten Muskel möchten wir vorläufig damit erklären, dass die Diffusion von ACh aus dem Extrazellularfluid in den Raum zwischen den terminalen Nervendigungen und der Endplattenmembran als limitierender Vorgang für Konzentrationshöhe und Verweildauer des ACh an der Endplatte in Erscheinung tritt. In gleichem Sinne würde auch die weitaus grössere Empfindlichkeit sowie der exponentiell anklingende und einem Sättigungswert zustrebende Verlauf der Kaliumausschüttung in Abhängigkeit von der ACh-Dosis am denervierten Muskel für einen Wegfall dieses Diffusionsvorganges durch Degeneration der neuralen Anteile der Endplattenkammer sprechen.

W. Kobinger, O. Kraupp,
H. Stormann und G. Werner

Pharmakologisches Institut der Universität Wien, den 15. Januar 1955.

Summary

Both hind limbs of cats (one being normally innervated, the other 8–12 days after denervation) were perfused and the quantities of potassium liberated from the two limbs in response to intraarterial injections of varying amounts of acetylcholine were compared by collecting the venous outflow from both sides separately; considerably larger quantities of potassium were found to be liberated from the denervated than from the innervated muscle after equal doses of ACH; the threshold dose of ACH for eliciting a measurable liberation of potassium being much lower on the denervated side. The dose response relation between injected ACH and potassium-liberation is of a different nature for innervated and denervated muscle. The results obtained are compatible with expectations derived from the "short circuit theory" of the transmitter action on the neuromuscular endplate (Fatt and Katz). The reasons of the difference in the dose relations for the innervated and denervated muscle are discussed.

[1] B. D. Burns und W. D. M. Paton, J. Physiol. *115*, 41 (1951).

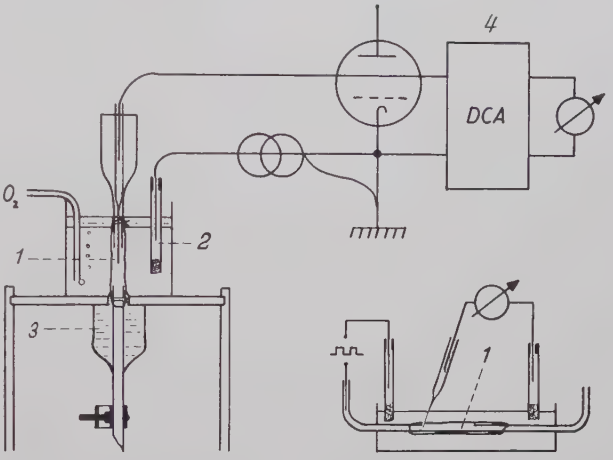
Measurement of the Potential Difference Across the Connective Tissue Sheath of Frog Sciatic Nerve

There is evidence that the connective tissue sheath of a nerve trunk restricts the passage of ions (e.g.[1]). The aim of the present work was to find out whether the sheath resembled other membranes such as the frog skin[2] in yet another respect, in their ability to build up a potential difference by the operation of an active ion "pump".

[1] K. Krnjevic, J. Physiol. *123*, 338 (1954). – A. M. Shanes, J. Cell. Comp. Physiol. *43*, 87 (1954); *99* (1954).

[2] H. H. Ussing and K. Zerahn, Acta Physiol. Scand. *23*, 110 (1951).

The longest unbranched part of the frog sciatic was used. A simple way of obtaining a sheath in its normal position was to draw the fibers out of the nerve against each other from either end until the sheath was left free. The sheath was then tied at one end to a small glass funnel through which a 3 M KCl microelectrode could be introduced, and at the other end to a polyethylene tube, so that solutions inside the sheath could be rapidly changed. It was placed vertically in the bath as shown in the figure with a layer of paraffin oil covering each binding, to prevent possible short circuiting. The potential inside this "sausage" was measured against an indifferent electrode in the bath. "Inside-out" preparations were obtained by drawing the sheath back over the nerve[1].



Arrangement for measuring sheath potential. *1* Nerve sheath; *2* Ringer bath; *3* Paraffin oil; *4* Cossor *DC* Amplifier. Inset: Arrangement for measuring sheath resistance.

To measure the electrical resistance the sheath was drawn over a polyethylene tube with a longitudinal slit (Figure inset). A square wave of constant current was applied between the inside of the polyethylene tube and the Ringer bath. A 3 M KCl microelectrode was inserted into the "sausage" in order to measure the voltage changes produced by current flow. Cable equations were used to calculate the resistance of the sheath[2] (case 1).

With Ringer solution on either side, the potential difference across the sheath had values of a few mV, not exceeding a limit of 10 mV. (Outside was negative to inside when "right side out" and inside negative to outside when "inside out".) The absence of any considerable potential difference might be due to damage done to the sheath during dissection. Therefore, with three "sausages", the electrical resistance of the sheath was measured and found to be of the order of 500 Ωcm^2. The space constant (distance from leading-in electrode at which amplitude of potential change drops by a factor e) had values between 2 and 3 mm. This result roughly corresponds to electrical data obtained for the sheath of *intact* frog nerve[3] (Fig. 6), suggesting that no considerable damage was done to the sheath in the process of removing the nerve fibers. However, it also follows that any "pump" displacing net electric charge across the

[1] F. Crescitelli and T. A. Geissman, Amer. J. Physiol. *164*, 2, 509 (1951).

[2] S. Weidmann, J. Physiol. *118*, 348 (1952).

[3] C. Rashbass and W. A. H. Rushton, J. Physiol. *110*, 110 (1949).

sheath would be short-circuited by a rather low leak resistance (500 Ωcm^2 as against 2000 Ωcm^2 in frog skin). Therefore, while it seems of interest to report the absence of any large potential difference, it would not be permissible to decide for or against an ion "pump".

The present work was carried out during the tenure of a National Science Foundation fellowship. My gratitude is due to Prof. A. von Muralt for hospitality and generous loan of equipment. I also wish to thank Prof. R. Stämpfli and Dr. S. Weidmann for advice and criticism.

M. Nicely

Hallerianum, Berne, January 27, 1955.

Zusammenfassung

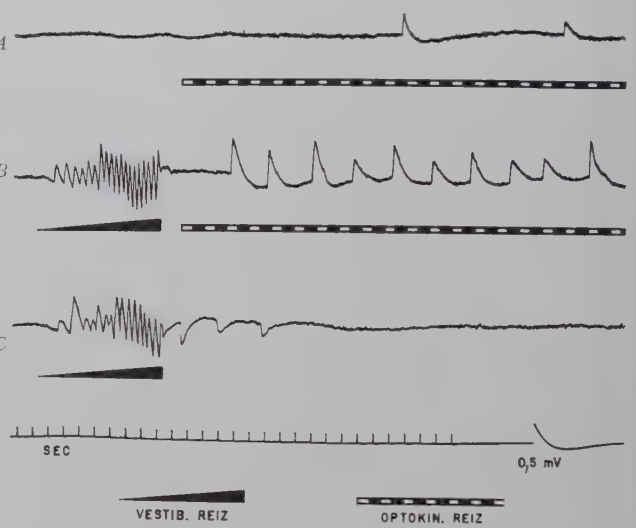
An der bindegewebigen Hülle des Froschischiadicus (Epineurium plus Perineurium) konnte keine nennenswerte Potentialdifferenz (< 10 mV) gefunden werden.

Über einen Bahnungseffekt bei sukzessiver Einwirkung von vestibulären und optokinetischen Reizen

Bekanntlich können vestibulärer und optokinetischer Nystagmus interferieren und – bei Richtungsverschiedenheit – einander komplett auslöschen[1]. Dabei handelt es sich keineswegs um eine einfache mechanische Superposition der Nystagmusphasen, sondern um eine integrative Verarbeitung der aus den beiden Sinnessystemen einströmenden Erregungen. Diese Tatsache bildet eine wesentliche Stütze für die Annahme, dass beide Nystagmusformen ein gemeinsames Koordinationszentrum besitzen. Die bei ausschliesslicher Verwendung von Simultanreizen beobachteten Effekte legten es nahe, die Verhältnisse bei Sukzessivreizung zu untersuchen.

Bei 9 jungen Kaninchen (0,4–0,9 kg) wurden die Augenbewegungen elektronystagmographisch aufgenommen. Das wache, nur mit einem Kopfhalter fixierte Tier sass in natürlicher Haltung auf einer kugelgelagerten und mit grossen Massen belasteten Drehscheibe, der durch eine Torsionsfeder eine konstante Winkelbeschleunigung erteilt werden konnte. Gleichzeitig befand sich das Tier im Inneren eines Drehzylinders, der ein Reizmuster von schwarz-weissen senkrechten Streifen (Breite 11°) trug und durch einen Kymographionmotor mit variabler Geschwindigkeit im oder gegen den Uhrzeigersinn rotiert werden konnte. Auf Grund von Vorversuchen wurde als vestibulärer Reiz eine Winkelbeschleunigung von 11°/s² und 8 s Dauer, für den optokinetischen Reiz eine Streifengeschwindigkeit von 10°/s gewählt. Die Versuche wurden im verdunkelten Raum durchgeführt, so dass die vestibuläre Reizung unter kompletter Ausschaltung aller optischer Reize gesetzt werden konnte, während die folgende optokinetische Reizung durch gleichzeitige Einschaltung von Innenbeleuchtung und Motor des Drehzylinders begonnen wurde. Beginn und Ende der beiden Reize wurden in den Aufnahmen markiert. Die Registrierung der Elektronystagmogramme erfolgte in analoger Weise wie in früheren Versuchen beim Meerschweinchen[2].

Der optokinetische Nystagmus wird beim Kaninchen durch stillstehende Kontraste im Gesichtsfeld stärker gehemmt und ist daher schwieriger auszulösen als beim Menschen (ter Braak[1]). Wie Abbildung *A* zeigt, entwickelte er sich auch unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nur allmählich, wobei erst nach minutenlanger Reizung ein stationärer Zustand erreicht wurde. Hingegen kam es nach einer kurzen Drehbeschleunigung, die einen kurzdauernden vestibulären Nystagmus erzeugte, zu einer schlagartigen Entwicklung der optokinetischen Reaktion (Abb. *B*). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Tatsache, dass dieser Bahnungseffekt vom Richtungsverhältnis der beiden Sukzessivreize prinzipiell unabhängig war und auch noch bei Reizintervallen von 5 s regelmässig auftrat. Dieser wesentliche Unterschied gegenüber den bekannten Interferenzeffekten bei Simultanreizung konnte durch Beobachtungen bei optokinetischer Dauerreizung und überlagerter kurzer Drehbewegung bestätigt werden: Trotz komplexer Bedingungen und dementsprechender Verschiedenheit der Interferenzbilder resultierte als überdauernder Effekt niemals eine Abschwächung, häufig aber eine Verstärkung der optokinetischen Reaktion. Da der beschriebene Bahnungseffekt auch nach verhältnismässig langen Intervallen zwischen den beiden heterogenen Sukzessivreizen auszulösen war, ist die Beteiligung eines Zwischenneuronenlagers anzunehmen, dessen Synapsenreichtum eine entsprechende Persistenz der Aktivität gewährleistet. In erster Linie kommt hierfür das von H. W. Magoun ausführlich untersuchte retikuläre Bahnungssystem des Hirnstammes in Frage[2].



Elektronystagmogramme (Kaninchen). – *A* Optokinetische Reizung (Drehzylinder linksdrehend). – *B* Optokinetische Reizung (wie bei *A*) nach kurzer vestibulärer Reizung (Rechtsdrehung), Reizintervall etwa 1,5 s. – *C* Vestibuläre Reizung (wie bei *B*).

Wenn auch die untersuchte Reizsituation (zeitliche Trennung von vestibulärem und optokinetischem Reiz) in biologischer Hinsicht einen hohen Grad von Unwahrscheinlichkeit besitzt, so erscheint doch der nachgewiesene Bahnungseffekt sinnvoll. Da bei den nicht fixierenden Tieren der rein subkortikal gesteuerte optokinetische Nystagmus unter Normalbedingungen nur durch gleichsinnige Verschiebung der Gesichtsfelder ausgelöst wird, wie sie praktisch nur bei drehenden Eigenbewegungen auftritt, besteht in der biologischen Reizsituation eine zwangsläufige Koppelung mit labyrinthären Reaktionen.

[1] E. Huizinga und P. van der Meulen, Ann. Otol. *60*, 927 (1951).

[2] H. Bornschein und G. Schubert, Z. Biol. *107*, 95 (1954).

[1] J. W. G. ter Braak, Arch. Néerl. Physiol. *21*, 309 (1936).

[2] D. B. Lindsley, Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. *30*, 174 (1952).

Dies lässt annehmen, dass die optomotorische Reaktion bei diesen Tieren nur eine kontrollierende Hilfsfunktion darstellt, die im Bedarfsfall durch vestibuläre Reaktionen schlagartig aktiviert wird.

H. Bornschein und F. Krejci

Physiologisches Institut der Universität Wien und I. Universitätsklinik für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfkrankheiten, Wien, den 11. Dezember 1954.

Summary

In the rabbit rotatory vestibular stimulation followed by optokinetic stimulation has a persisting facilitatory effect on the latter. The facilitation is independent of the direction of the second stimulus relative to the first one. It can therefore not be explained on the basis of the well-known addition effect in simultaneous stimulation. The neurophysiological and biological aspects of the phenomenon are discussed.

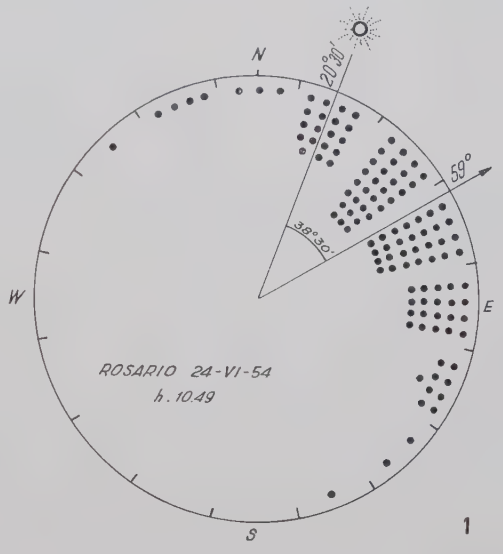
Experiments on the Sense of Time in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda)

Recent researches have shown that the amphipod *Talitrus saltator* (Montagu) has a natural orientation mechanism based on the position of the sun, which permits it to maintain a determined constant direction of escape[1]. The orientated escape reaction is released when animals living on the damp sand of the beach are transferred to a dry place, whereupon they attempt to return to the sea, following a line approximately at right angles to the coast. The population which was the principal object of the aforesaid research live at S. Rossore, near Pisa, on a coast which runs approximately in a North-South direction with the sea lying westwards. The escape direction of the individual members of this population oscillates therefore around an azimuth of 270°[2].

To maintain this constant escape direction, the animals assume an angle with the sun which varies during the course of the day from between approximately 180° and 0°. The orientation angles decrease from morning till sunset with the decreasing of the distance of the sun from the West. The animals in their escape almost always keep the sun on their left side, except when the sun is between East and North or between West and North.

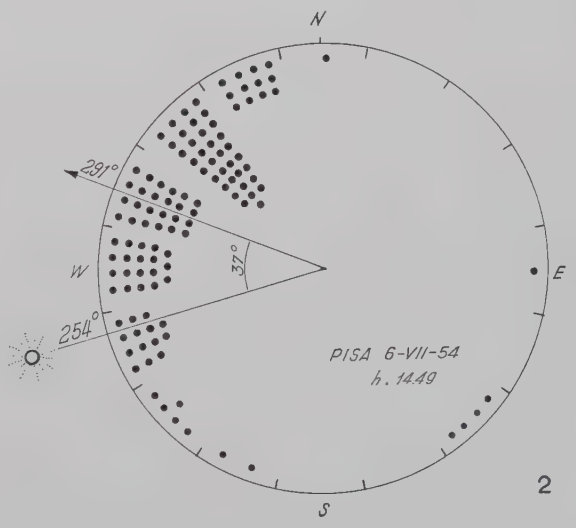
Numerous experiments have been made to discover what mechanism the animals use to modify, in a regular and continuous manner, their orientation angle with the sun during the course of the day[3]. Since the influence of all principal external factors on the adjustment of the orientation angle, as for example the variation of the sun's height on the horizon, were excluded, it was justifiable to conclude that the reaction depended on an interior physiological mechanism or, in other words, on a proper sense of time in the animals.

To this series of indirect proofs of the existence of a sense of time, I can now add a direct proof given by a new experiment, the logic presupposition of which is as follows: Since the *Talitrus* makes a different angle with the sun at each hour of the day, if it were transferred to a tangibly different longitude, would it behave according to the time of the place of origin, or according to local time? In the former case, the existence of an internal time-keeping mechanism will be demonstrated, while the latter case would show that the width of the angle with the sun is adjusted according to external factors. Similar experiments have been planned long ago by Frisch[1] for bees but not yet carried out.



1

Last June as N. Arrighini (Pietrasanta, Lucca) had to go to Argentina he kindly offered to make the experiment. I wish to express herewith my sincere appreciation of his interest and of the accuracy with which he performed this experiment.



2

A group of *Talitrus* of S. Rossore (belonging to the same population of which the escape direction has been described above) was collected on the 10th of June and kept in the dark until the time of the experiment made in Rosario de Santa Fé on the following 24th of June. Thirteen *Talitrus* were put in a basin covered

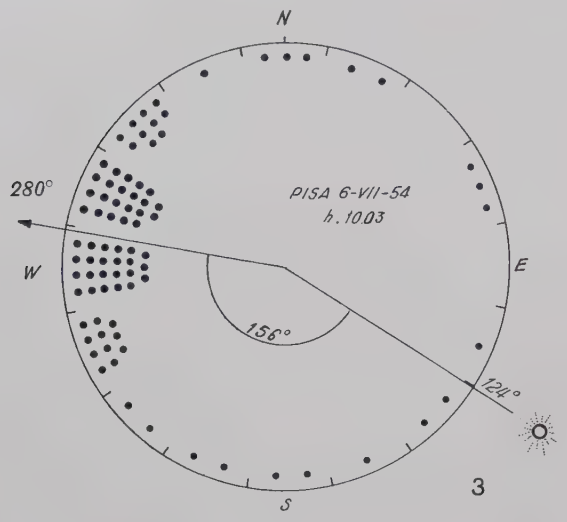
[1] L. Pardi and F. Papi, Naturwissenschaften *39*, 262 (1952); Z. vgl. Physiol. *35*, 459 (1953).

[2] The azimuths and resulting directions are in degrees from North through East-South-West.

[3] F. Papi and L. Pardi, Z. vgl. Physiol. *35*, 490 (1953).

[1] K. von Frisch, *Aus dem Leben der Bienen* (Springer-Verlag Berlin, 1941), pp. 123–124.

with a glass[1] and placed where the sight of the sky was not obstructed by objects of the landscape. The animals, as always, crowded up in determined sectors trying to escape. Their distribution was recorded by nine photographs taken between 10·38 and 11·05 h (Argentina mean solar time). Figure 1 represents the total distribution of the 117 positions observed, the resulting direction of escape, and the position of the sun at 10·49 h[2] (average time in which the photographs were taken). Consequently the animals on the average keep the sun on their left side by 38° 30′.



As soon as the results of this experiment came to my knowledge[3], I performed a controlling test in Pisa with the same number of specimens at the Italian local time (14·38–15·05 h), corresponding to the time of the above-quoted experiment in Argentina. The result is shown in Figure 2. The azimuth of the sun at the average time was approximately 254°, the resulting direction amongst the 117 positions of the animals observed was 291°. Therefore the animals keep the sun on their left side by 37°. The statistical analysis of the results of this experiment and the one performed in Argentina show that the differences between the distribution in relation to the sun have no significance ($P > 0{\cdot}9$). I must acknowledge that the results agree more exactly than was to be expected, considering the variability of the orientation angle even at a determined hour of the day.

Another experiment was made to establish which orientation angle the animals would assume if they had compensated for difference of longitude. Nine more photographs were taken in Pisa of a group of animals placed in a basin at approximately 10·03 h (average time), i.e. the Italian time at which the experiment was made in Argentina reduced by the difference of the time between Pisa and Rosario (approximately 4·46 h). The resulting direction between the 85 positions observed was 280°, the angle with the sun 156° (Figure 3). The difference between this distribution and the one given by the Rosario experiment appears to be statistically significant ($P < 0{\cdot}001$).

[1] For the experimental methods see L. Pardi and F. Papi 1953, *l.c.* (pp. 461–463).

[2] I wish to express my gratitude to Com. Enrico Laj of the Accademia Navale of Leghorn for assistance with the astronomical calculation.

[3] N. Arrighini, *in lit.* June 26, 1954.

The animals behaved therefore at 10·49 h in Rosario in the same manner as they would have behaved in Pisa at 14·49 h. Consequently it is proved that the *Talitrus*, transferred to a different longitude, adjust their orientation angle with the sun according to the time of the place of origin and not according to local time. This phenomenon demonstrates the existence of an internal sense of time[1].

F. Papi

Institute of Zoology and Comparative Anatomy, University of Pisa, October 28, 1954.

Riassunto

Il Crostaceo Anfipode *Talitrus saltator* (Montagu) possiede un meccanismo di orientamento solare che gli permette, mediante una variazione regolare e continua dell'angolo di orientamento nel corso del giorno, di mantenere una direzione di fuga praticamente costante. Esemplari del litorale tirrenico, trasportati in Argentina, hanno assunto un angolo di orientamento col sole conforme all'ora italiana nel momento della esperienza. Ciò dimostra che la regolazione dell'angolo di orientamento è dovuta ad un fattore endogeno e cioè che esiste in *Talitrus* un senso del tempo.

[1] L. Pardi and M. Grassi (cfr. this same number) comes to the same conclusion, following different method.

Experimental Modification of Direction-Finding in *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia deshayesei* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda).

By influencing the time-keeping mechanism ("innere Uhr") of starlings, K. Hoffmann[1] succeeded in modifying a given direction-finding that these birds had learnt in connection with the position of the sun.

After training two starlings to find food in a given direction, Hoffmann placed the birds in a dark room and subjected them to an illumination 6 h behind-hand in respect to normal conditions, i.e. the animals were kept in artificial light from 6 h after local sunrise to 6 h after local sunset. The temperature also was adjusted to conform with the new light conditions. After 12–18 days of this treatment, their steering by the sun for the direction they had learnt was modified exactly as expected. For example, the bird trained to find food to the west now sought it towards north, which can easily be accounted for, on recollecting that the "internal watch" of the animal was 6 h late. Hoffmann, moreover, proved that when the animals are again subjected to normal conditions of light (in the open air), they return to the direction learnt in their early training within a period of not more than 12 days.

It was interesting to apply this beautiful experiment of Hoffmann to *Talitrus*, for this Amphipod can steer its course on the shore in reference to the azimuthal position of the sun (mirror experiment) (Pardi and Papi; Aurich in von Buddenbrock; Papi and Pardi[2]).

Specimens removed from the moist sand return to it at any time of day, always following a more or less

[1] K. Hoffmann, Naturwissenschaften *40*, 608 (1953).

[2] L. Pardi and F. Papi, Naturwissenschaften *39*, 162 (1952); Z. vgl. Physiol. *35*, 459 (1953). – Aurich in W. von Buddenbrock, Sinnesphysiologie, Verlag Birkhäuser (1952). – F. Papi and L. Pardi, Z. vgl. Physiol. *35*, 490 (1953).

straight track, whose angle with the sun varies continually during the course of day. The fact that here the sun is the pre-eminent factor of orientation, as it is in bees (v. Frisch[1]) and in birds (Kramer, Matthews[2]), seems to imply, even in the case of *Talitrus*, a capacity for taking the time of day into account (Pardi and Papi, Papi and Pardi[3]). In these earlier papers, the authors advanced the opinion that the daily adjustment of the angle of orientation depended on an endogenous factor based on processes following a daily rhythm ("Zeitsinn"), and at the same time they excluded the influence of various external factors on this adjustment.

Hoffmann's experiment was most appropriate for testing the validity of such a hypothesis for *Talitrus*.

Having ascertained in some recent unpublished experiments that *Talorchestia deshayesei* (Audouin) also possesses this same mechanism of orientation, we extended our experiments to this species. The population of *Talitrus saltator* of San Rossore (Pisa), where the coast line follows approximately a N.-S. direction and the sea lies to the west, has an average daily line of escape towards 263° (in May and June). The specimens of *Talorchestia deshayesei* were gathered in Lavagna (East Riviera), where the coast line runs in a N.W.-S.E. direction. This population has an average line of movement towards 216°, i.e. roughly towards S.W., as was ascertained in a limited number of tests carried out this spring.

At Turin the following experiments were performed:

(1) *Talitrus saltator* (March-June). Experimental batch: from 12 to 24 h, artificial light and temperature 24°C; from 24 to 12 h, darkness and temperature varying somewhere between 15°C and 19°C. Controls: a batch in normal conditions of light and temperature.

(2) *Talitrus saltator* (April-June). Experimental batch: from 12 to 24 h, artificial light; from 24 to 12 h, darkness; temperature constant throughout, 24° ± 0·5°C. Controls: one single batch in normal conditions of light and temperature.

(3) *Talitrus saltator* (May-June). Experimental batch: from 12 to 24 h, artificial light; from 24 to 12 h darkness; variable room-temperature. Controls: as in the preceding experiment.

(4) *Talorchestia deshayesei* (June-July). Experimental batch: artificial light from 6 h after local sunrise to 6 h after local sunset (Turin). Variable room-temperature. Controls: artificial light from local sunrise to local sunset and variable room-temperature.

(5) *Talorchestia deshayesei* (June-July). Artificial light from 12 h after local sunrise to 12 h after local sunset. Controls: as in the preceding experiment.

The day following the commencement of the experiment, and later at more or less regular intervals in connection with meteorological conditions, 5 specimens of each batch (both experimental batches and control) were exposed to the sunlight and their orientation was registered by means of repeated counts. The orientation tests were all made between 15·00 and 16·00 for experiments 1–4; between 16h30′ and 17h30′ for experiment 5.

The essential conclusions are the following:

(1) Shifting the period of illumination, as in experiments 1–4, the line of movements is shifted constantly, though to a varying extent, in the expected direction, i.e. towards north. In figure 1 the average line of escape for *Talitrus saltator* (268° between 15 and 16 h in the spring months[1]) considered equal to 0°, while all the resultant directions observed from the fourth to the 26th day after the beginning of the experiment are shown as deviations in degrees from the average line of escape, with positive values when the deviation is towards

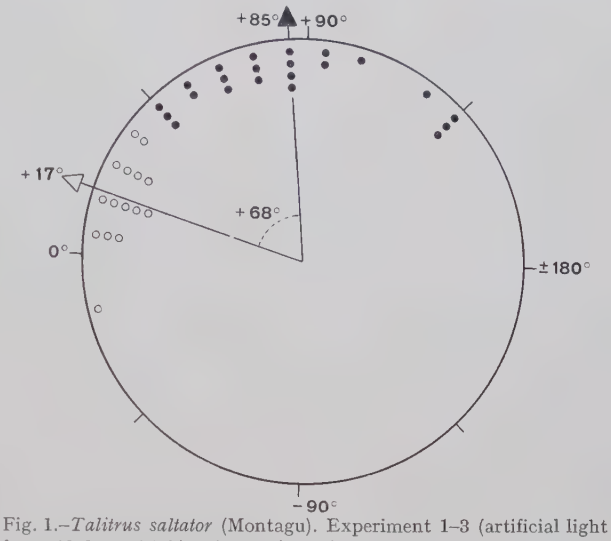


Fig. 1.–*Talitrus saltator* (Montagu). Experiment 1–3 (artificial light from 12 h to 24 h): observed resultant directions of the control (white circles) and experimental individuals (black circles) are shown as deviation in degrees from the average line of escape considered equal to 0°. Other explanation in text.

north, with negative values when towards south. The deviations obtained vary for the specimens under experiment from a minimum of + 45° to a maximum of + 146° with an average of + 85°; for the controls, which also show a slight shifting northwards in their line of movement (+ 17°), the minimum and maximum values found respectively are − 16° (southward deviation) and + 38°. The difference (+68°) between the two distributions is statistically significant ($P < 0{\cdot}01$).

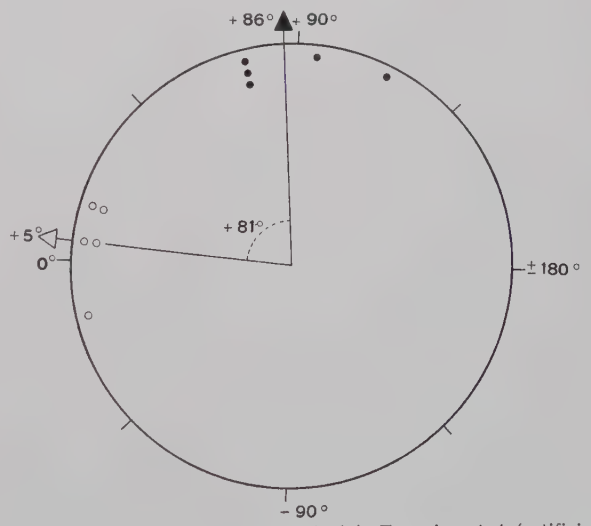


Fig. 2.–*Talorchestia deshayesei* (Audouin). Experiment 4 (artificial light from 6 hours after sunrise to 6 hours after sunset). Explanation as in Figure 1.

Figure 2 shows the results obtained with *Talorchestia*, which correspond exactly to those obtained with *Tali-*

[1] K. von Frisch, Exper. *5*, 142 (1949).

[2] G. Kramer, Exper. *94*, 265 (1952). – B. V. T. Matthews, J. Exp. Biol. *30*, 243 (1953).

[3] See footnote 2, p. 202, loc. cit.

[1] L. Pardi and F. Papi, Z. vgl. Physiol. *35*, 470 (1953).

trus. While controls present a small deviation in their line of movement (+ 5° in average) the specimens under experiment have a marked northward deviation (+ 86° in average). (Difference between controls and experimental specimens = + 81°, $P < 0{\cdot}01$).

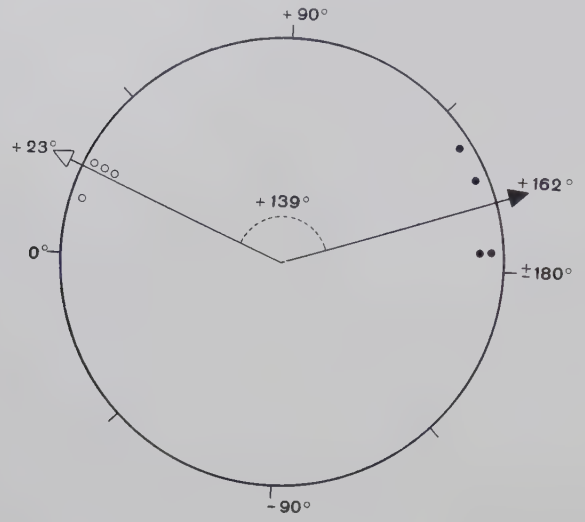


Fig. 3.–*Talorchestia deshayesei* (Audouin). Experiment 5 (artificial light from 12 h after sunrise to 12 h after sunset). Explanation as in Figure 1.

Though the causes of the considerable variability which was noted are as yet to be investigated, it is definitely ascertained that *changes in the period of illumination*, as described above, *cause a deviation of flight very near, in average value, to what was expected* (+ 90°). In other words, the animals under experiment, exposed to the afternoon sun, behave as if it were morning.

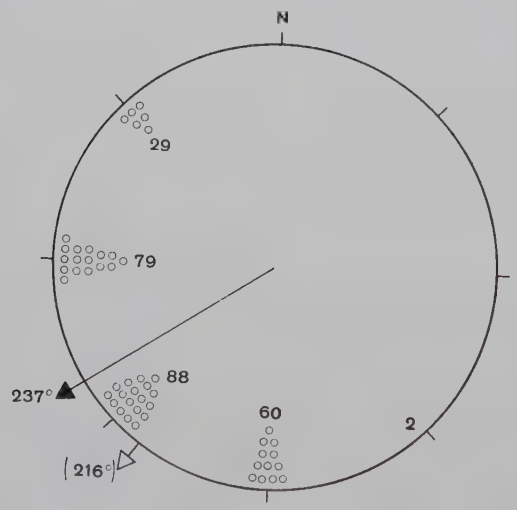


Fig. 4*a*.–*Talorchestia deshayesei* (Audouin). Experiment 5 (artificial light from 12 h after sunrise to 12 h after sunset). Observed positions of the *control* individuals between 17 h 07′ and 17 h 12′ on 19th of July, 9 days after the beginning of the experiment. Each circle: 5 observed positions of the animals which show a very little deviation from the average line of escape (216°).

(2) The deviation in the line of escape takes place by degrees and, within the first four days of treatment, reaches its maximum, which is subsequently maintained with more or less considerable fluctuations.

(3) Also with a constant temperature (experiment 2), results were instructive: a considerable shift of line of escape having been obtained in the expected direction (average of 100°); this proves that the normal daily variations of temperature have no perceptible influence on the processes by which the angle of direction is regulated.

(4) When the individuals used in these experiments were returned to normal conditions, i.e. to natural light or even to artificial light synchronized with local daylight-time (i.e. from dawn to sunset) they all returned gradually, within the space of 4 days, to their normal line of escape.

(5) When light is given in periods, which are 12 h behind normal daylight time (experiment 5 with *Talorchestia*), the change of the line of movement in the foreseen direction is still more marked (average of + 162°) (Fig. 3 and 4); the animals exposed to sunlight late in the afternoon, behave as if it were early morning[1].

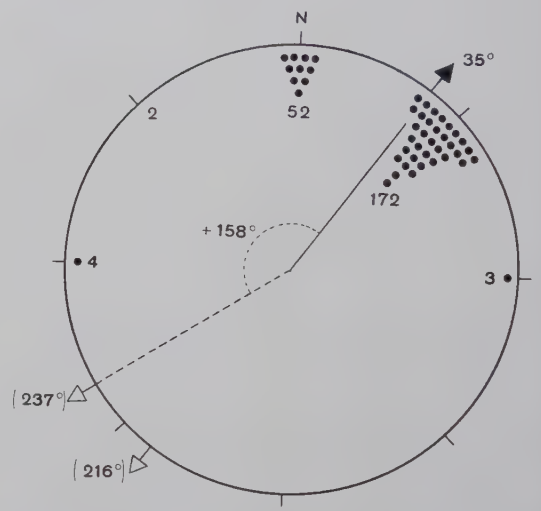


Fig. 4*b*.–*Talorchestia deshayesei* (Audouin). Experiment 5 (artificial light from 12 h after sunrise to 12 h after sunset). Observed positions of the *experimental* individuals between 16 h 52′ and 17 h 00 on 19th of July, 9 days after the beginning of the experiment. Each circle: 5 observed positions of the individuals which show a very great deviation from the average line of escape (216°). The line of escape of the controls (237°) and the deviation from the controls is also given

(6) Together with orientation, rhythm of surface activity also changes: In experiment 1, repeated counts of the number of animals on the surface showed that the curve of activity was retarded by about 5 h as compared with that of controls kept in natural light.

These are the results of the "Hoffmann experiments". In the present experiment, an attempt has also been made to modify the line of movement by raising and lowering temperature. During 18 h preceding the experiment in sunlight, the animals (*Talitrus saltator* and *Talorchestia deshayesei*) were subjected to temperatures of + 35° to 37° or of + 4° to 6°C. The exposure to low temperature gave no valuable results; but the high temperatures, in both the experiments carried out, caused a limited but significant change in the line of escape: *when exposed to sunlight, the individuals which were subjected to high temperatures move with a sharper angle than the controls*. For *Talitrus saltator* and *Talorchestia deshayesei*, a difference of 31° and of 46° respectively was ascertained between controls and

[1] Corresponding results have been obtained this summer with a different population of *Talitrus saltator* (line of escape = 201° ca.).

specimens subjected to high temperatures. The inference may be drawn that the high temperature accelerates, to a slight degree, the internal process by which the angle of orientation is determined: the internal time-measuring apparatus of the animals subjected to high temperatures is thus in advance when compared with that of the controls.

Further experiments are being carried out. At present the results obtained appear to prove the following points:

(a) As had been assumed, and in accordance with what HOFFMANN has established for Birds, the adjustment of the angle of orientation in *Talitrus* and *Talorchestia* is based on an endogenous factor, i.e. on physiological processes having a daily rhythm ("innere Uhr", "Zeitsinn")[1].

(b) It is possible, also in the case of *Talitrus* and *Talorchestia*, to influence these processes by altering the period of illumination; and this alteration takes place even if temperature conditions remain unchanged.

(c) It is possible to determine a perceptible change in the line of escape by exposing the animals to comparatively higher temperatures before investigating the direction in which they escape.

L. PARDI and M. GRASSI

Zoological Institute of the University of Turin (Italy), October 29, 1954.

Riassunto

Talitrus saltator (Montagu) e *Talorchestia deshayesei* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda), allontanati dalla sabbia umida della spiaggia, sono in grado di ritornarvi, mantenendo una direzione di fuga praticamente costante in base alla posizione azimutale del Sole. La regolazione dell'angolo di orientamento col Sole nel corso del giorno è basata sul senso del tempo, come dimostrano esperienze simili a quelle recentemente eseguite da HOFFMANN per gli Storni. È possibile ottenere una significativa deviazione della direzione di fuga, sottoponendo gli animali a temperature relativamente alte prima di saggiare il loro orientamento.

[1] F. PAPI, following a different method, comes to the same conclusion (*vide* this same volume).

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Über die Genauigkeit der Brenztraubensäure-Bestimmung als 2,4-Dinitrophenylhydrazon

Vergleich der direkten kolorimetrischen mit der quantitativ-chromatographischen Methode

Von S. MARKEES[1], Basel

Die Wichtigkeit zuverlässiger Nachweismethoden für die Brenztraubensäure (BTS) ist bei Betrachtung der in den letzten Jahren gewaltig angewachsenen Zahl von Arbeiten über dieses Stoffwechselprodukt unverkennbar. Dabei muss daran erinnert werden, dass für die früher unter die Gruppe der «bisulfitbindenden Substanzen» gerechnete und als solche quantitativ bestimmte Säure erst 1939 von LU[2] ein praktisch brauchbares Bestimmungsverfahren für das Blut entwickelt worden ist, das nach dem Prinzip der Umsetzung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin arbeitet. Durch FRIEDEMANN und HAUGEN[3], nach deren Angaben die BTS heute ziemlich allgemein bestimmt wird, ist dieses Verfahren nur hinsichtlich des Extraktionsmittels – Toluol statt Essigester – abgeändert worden. Das mit der BTS gebildete 2,4-Dinitrophenylhydrazon ist in alkalischer Lösung rot gefärbt und gut kolorimetrierbar. Diese Reaktion ist naturgemäss unspezifisch, da alle α-Ketosäuren und teilweise auch einige β-Ketosäuren sich mit dem Reagens umsetzen. Über die Ausschaltung der wesentlichsten Fehlerquelle, der Azetessigsäure, durch kurzfristiges Erhitzen des Blutfiltrates vor dem Zusatz des 2,4-Dinitrophenylhydrazins haben wir früher berichtet[1]. Den mit dem Aufkommen der Papierchromatographie in der Literatur[2] auftauchenden Zweifeln an der Genauigkeit der kolorimetrischen Bestimmung der BTS als 2,4-Dinitrophenylhydrazon sind wir dann gemeinsam mit GEY[3] in einer Arbeit entgegengetreten, in der das direkte kolorimetrische Verfahren mit dem quantitativ-chromatographischen verglichen worden ist. Es hat sich damals eine ausreichende Übereinstimmung der gefundenen Absolutwerte ergeben. Nachdem aber neuerdings in der Literatur[4] darüber berichtet worden ist, dass bei Verwendung einer fermentchemischen Methode mit Milchsäure-Dehydrogenase, die als spezifisch angesprochen wird, niedrigere Werte für die BTS gefunden werden als mit der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Methode, haben wir es für erforderlich gehalten, dieses Verfahren noch einmal sehr eingehend auf Genauigkeit, bzw. seine Spezifität zu überprüfen. Dabei hat sich vor allem die Notwendigkeit herausgestellt, die papierchromatographische Methode grundlegend neu zu bearbeiten und sie

[1] Aus den Medizinischen Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

[2] G. D. LU, Biochem. J. *33*, 249 (1939).

[3] TH. E. FRIEDEMANN und G. E. HAUGEN, J. Biol. Chem. *147*, 415 (1943).

[1] S. MARKEES, Exper. *7*, 314 (1951).

[2] D. CAVALLINI, N. FRONTALI und G. TOSCHI, Nature *163*, 568 (1949).

[3] S. MARKEES und F. GEY, Helv. physiol. Acta *11*, 49 (1953).

[4] K. JOHANNSMEIER, H. REDETZKI und G. PFLEIDERER, Klin. Wschr. *32*, 560 (1954).

im Rahmen der Gesamtdarstellung des gegenwärtigen Standes dieses Problems wiederzugeben.

Wie bereits verschiedentlich früher von uns beschrieben[1], zeigt das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS im Papierchromatogramm zwei scharf voneinander getrennte Flecke mit den Rf-Werten von 0,36 (*A*) und 0,57 (*B*). Diese beiden Flecken entsprechen nach den übereinstimmenden Feststellungen von Stewart[2] und Isherwood und Cruickshank[3] isomeren Formen des Hydrazons. Sie bilden sich regelmässig, das heisst sowohl bei Verwendung von Pyruvatlösungen bekannter Konzentrationen als auch bei Umsetzung der im Blute befindlichen BTS mit dem Reagens. Andere bei der Chromatographie der 2,4-Dinitrophenylhydrazone auf dem Papier erscheinende Flecken, die zu einer Verwechslung mit den genannten Flecken *A* und *B* führen könnten, kommen bei der Chromatographie des Blutfiltrates nicht vor.

Das α-Ketoglutarsäure-2,4-dinitrophenylhydrazon hat einen Rf-Wert von 0,12, das entsprechende Hydrazon der Oxalessigsäure einen Rf-Wert von 0,18; das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Azetessigsäure liegt zwischen den Flecken *A* und *B* mit einem Rf-Wert von 0,45, wird aber durch Erhitzen des Filtrates vor dem Umsetzen mit dem Reagens zersetzt und kommt gar nicht zur Darstellung. Überschüssiges 2,4-Dinitrophenylhydrazin ist infolge seines Rf-Wertes von 0,90 ebenfalls deutlich abgegrenzt.

Bei der Gewinnung des das BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon enthaltenden Extraktes sind wir ursprünglich folgendermassen vorgegangen: Enteiweissung des Blutes mit Na-Wolframat-H_2SO_4; Trichloressigsäure, die bei dem kolorimetrischen Verfahren benützt wird, ist hier unbrauchbar, weil starke Schlierenbildung auf dem Papier auftritt, wenn nachher Essigester zur Extraktion benützt wird. Umsetzen des während 5 min im kochenden Wasserbad gehaltenen und wieder abgekühlten Blutfiltrates mit einer gesättigten Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin während einer halben Stunde. Zwei- bis dreimalige Extraktion des Reaktionsgemisches mit Essigester, anschliessende Extraktion der Hydrazone mit 10%iger Natriumcarbonat-Lösung, Ansäuern mit konzentrierter HCl bis zu einem pH von etwa 2 in eisgekühlter Lösung, dann Extraktion mit Essigester, Verwerfen der wässerigen Phase, nach einmaligem Nachwaschen mit H_2O dest. Eindampfen zur Trockne, Auftropfen einer abgemessenen Menge auf Whatman-Nr.-1-Papier. Das Chromatogramm läuft 14 h aufsteigend in mit 3%igem Ammoniak gesättigtem Butanol. Trocknen des Papiers bei Zimmertemperatur. Abgrenzung der oben genannten Flecken *A* und *B*, Ausschneiden und feines Zerschnitzeln. Eluierung der Schnitzel mit bekanntem Volumen Carbonat für 2–3 h unter Schütteln, Abnutschen, Zusatz von 2*n* NaOH und Kolorimetrie nach etwa 2 min.

Wenn man nach dieser Vorschrift vorgeht und die erhaltenen Extinktionen mit denen vergleicht, die bei Anwendung der direkten Kolorimetrie gefunden werden, dann stellt man stark variierende Verluste bis zu 60% fest. Eine derart ungenau arbeitende Methode ist selbstverständlich zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der direkten kolorimetrischen BTS-Bestimmung völlig ungeeignet. Unsere Bemühungen haben sich darum auf die Aufklärung der Ursachen für derart grosse und schwankende Fehler bei der quantitativen papierchromatographischen Methode gerichtet. Wir haben dabei zunächst festgestellt, dass das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS licht- und temperaturempfindlich ist. Wurden die Reaktionen unter Ausschluss von Tageslicht und unter Vermeidung jeder längeren Erwärmung vorgenommen (speziell beim Eluieren der Papierschnitzel darf nicht im erwärmten Wasserbad geschüttelt werden), dann fielen die Ausbeuten bereits um 11–29% besser aus (Tabelle I). Folgende weitere Faktoren wurden variiert:

1. Verarbeitung des Blutfiltrates sofort und nach Stehenlassen für einige Zeit;
2. Verwendung von Plasma statt Vollblut;
3. Verlängerung der Reaktionszeit des Blutfiltrates mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin;
4. Verlängerung der Ablesezeit nach dem NaOH-Zusatz;
5. Zusatz von Natriumpyruvat (zur Feststellung der Ausbeute) erst nach dem Enteiweissen.

Alle diese Variationen hatten auf das Endergebnis keinen Einfluss.

Tabelle I. Vergleich der bei direkter Kolorimetrie und bei quantitativer Chromatographie gewonnenen Werte.

a) Zusätze von BTS zu Blut und Ermittlung der Ausbeute nach einer Eichkurve, die durch Photometrie eingewogener Mengen fertigen Hydrazons gewonnen wurde.

BTS-Zusätze zu Blut in γ/cm³	Gefunden, abzüglich Blutwert, γ/cm³	Ausbeute in %	Ausbeute verglichen mit direkter Methode
10	8,6	86	—
20	16,3	81,5	—
30	24,6	82	—
50	40,2	80,5	—

b) Durchführung der Reaktionen bei Tageslicht und Eluierung des Hydrazons aus dem Papier *mit* Erwärmung.

10	4,6	46	53
20	8,7	43	53
30	15,2	51	62
50	28,5	57	71

c) Durchführung der Reaktionen im verdunkelten Raum *ohne* Erwärmung.

10	7,4	74	86
20	11,4	57	70
30	18,6	62	76
50	43,2	86	107

Der zweite, wohl wesentlichste Punkt betrifft die leichte Zersetzlichkeit des 2,4-Dinitrophenylhydrazons in saurem Milieu. Bei dem obengenannten Verfahren wird das Hydrazon aus dem Carbonatextrakt in Essigester, nach Ansäuern bis auf pH 2, übergeführt. Wir haben in Kontrollansätzen mit synthetisch gewonnenem 2,4-Dinitrophenylhydrazon festgestellt, dass dieses bereits nach kurzem Stehen unter Zersetzung 2,4-Dinitrophenylhydrazin abspaltet, so dass die Ausbeute abnimmt. Auf dem Chromatogramm erkennt man diese Spaltung leicht an der zunehmenden Intensität des Fleckes mit Rf 0,9. Je länger das Hydrazon in stark saurem Milieu stehengelassen wird, desto grösser ist der

[1] S. Markees und F. Gey, Helv. physiol. Acta *11*, 49 (1953). – S. Markees, Biochem. J. *56*, 703 (1954).

[2] H. B. Stewart, Biochem. J. *55*, XXVI (1953).

[3] F. A. Isherwood und D. H. Cruickshank, Nature *173*, 121 (1954).

Verlust. Je höher die Ausgangskonzentration an Hydrazon, desto mehr macht sich die Zersetzung bemerkbar (Tabelle II).

Tabelle II. Zersetzung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS unter verschiedenen Säurezusätzen und bei wechselnden Reaktionszeiten.

a) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in Carbonat gelöst und mit *konzentrierter HCl* auf etwa pH 1 gebracht.

Hydrazon γ	Extinktion	Gefunden, Hydrazon γ	Ausbeute %	Reaktionszeit
20	0,205	17,7	89	Sofortige
60	0,614	53,2	89	Bestimmung
20	0,168	14,5	73	60′
60	0,357	30,8	51	

b) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in wenig Carbonat gelöst und mit *Trichloressigsäure aufgefüllt.*

20	0,137	11,7	58	
40	0,323	27,8	69	5′
60	0,497	43,0	72	
100	0,847	73,6	73	

c) BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon in wenig Carbonat gelöst und mit Wasser aufgefüllt. Entsprechend der Enteiweissung von biologischem Material Wasser, *Na-Wolframat* und $^2/_3$ *n* H_2SO_4 zugesetzt.

20	0,080	6,8	34	
40	0,198	17,0	42	30′
60	0,349	30,0	50	
100	0,639	55,2	55	

Zur Ausschaltung der genannten Fehlermöglichkeiten war eine prinzipielle Umänderung der Methode unumgänglich notwendig. Wir sind schliesslich so zum Ziele gelangt, dass wir jeden Säurezusatz vermieden haben. Dies gelingt dadurch, dass, wie bei der direkten Kolorimetrie, das 2,4-Dinitrophenylhydrazon mit Toluol ausgeschüttelt wird. Da aber der bei der direkten Kolorimetrie verwendete grosse Überschuss von 2,4-Dinitrophenylhydrazin sich bei der Chromatographie störend auswirkt, indem sich die Flecke dann nicht mehr gut trennen, muss die Menge des Reagens auf die Hälfte herabgesetzt werden. Der Toluolextrakt wird nach Waschen mit Wasser und Filtrieren im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und diese Lösung direkt zur Chromatographie aufgetropft.

Die Verwendung von Toluol als erstes Extraktionsmittel des Reaktionsgemisches Blutfiltrat-2,4-Dinitrophenylhydrazin bringt noch einen weiteren Vorteil mit sich. Wir haben nämlich feststellen können, dass bei Extraktion mit Essigester und anschliessender Eluierung mit Carbonat ein nicht unbeträchtlicher Teil des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS im Essigester gelöst bleibt, das heisst also nicht in die Carbonatphase übergeht und damit für den weiteren Nachweis ausfällt. Dies ist bei Verwendung von Toluol nicht der Fall. Zur kolorimetrischen Nachweisbarkeit des Fleckens *B* als gefärbtes Hydrazon ist noch folgendes festzuhalten: Besprüht man das Chromatogramm mit NaOH-Lösung, dann färbt sich der Fleck *A* intensiv braunrot, während der Fleck *B* keine erkennbare Rotfärbung annimmt. Eluiert man aus einem Chromatogramm von synthetisch hergestelltem BTS-2,4-Dinitrophenylhydrazon, das in abgestuften Mengen aufgetropft wird, den Fleck *B* getrennt vom Fleck *A*, dann findet sich ein immer ungefähr gleich bleibendes Verhältnis von *B*:*A* im Werte von 1:4. Führt man den gleichen Versuch mit Blut durch, dem bekannte Mengen Pyruvat vor der Umsetzung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin zugegeben werden, dann ergibt sich im Chromatogramm eine Verteilung von *B*:*A* wie etwa 1:9. Da, wie oben erwähnt, der *B*-Fleck auf dem Papier keine Rotfärbung bei Alkalibenetzung zeigt, nach der Eluierung mit Carbonat aber wieder eine leichte Rotfärbung nach NaOH-Zusatz erkennbar wird, muss angenommen werden, dass sich das dem Fleck *B* entsprechende Isomere zum mindesten teilweise wieder in das Isomere *A* umwandelt. Eine ähnliche Beobachtung haben wir schon früher bei dem Versuch angestellt, die Substanz *B* auf dem Wege über die papierchromatographische Trennung zu isolieren und chemisch zu charakterisieren – ein Versuch, der wegen der Unbeständigkeit von *B* nicht zum Erfolg geführt hat[1].

Wird unter Berücksichtigung der bisher aufgeführten Verlustquellen für das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der BTS – Temperatur, Licht, Azidität, Lösungsmittel – eine BTS-Lösung bekannter Konzentration chromatographiert und anschliessend kolorimetriert, so erfasst man etwa 80% der Ausgangsmenge. Über die Ursachen des immer noch verbleibenden Verlustes lassen sich bisher keine quantitativ genauen Angaben machen. In der Hauptsache dürften die erwähnte Isomerisierung und der weitgehende Ausfall des Nachweises der Substanz *B* eine Erklärung abgeben; weiterhin macht sich die mit der ganzen Prozedur der Chromatographie zusammenhängende methodische Fehlerbreite störend bemerkbar. Praktisch hat der Nachweis dieses rund 20% betragenden Verlustes die Konsequenz, dass wir bei der Bestimmung der BTS im Blut mittels quantitativer Chromatographie regelmässig bekannte Mengen von BTS bzw. Natriumpyruvat dem Blut zusetzen müssen, um die exakte Ausbeute zu ermitteln. Da die Standardkurve für BTS in unserem Bereich streng linear verläuft, muss der für die Zusatzmenge gefundene Verlustbetrag proportional auch für die im Blute vorhandene BTS gelten und in Rechnung gestellt werden. Als Standard wird eine Kurve benützt, deren Werte nach Zusatz von BTS in ansteigenden Mengen zu Blut gewonnen sind.

Unser Ziel war, wie eingangs erwähnt, die Kontrolle der mit der direkten Kolorimetrie bestimmten BTS-Werte des Blutes auf quantitative Genauigkeit. Wir wollten mit anderen Worten wissen, ob tatsächlich bei der direkten Kolorimetrie durch die «unspezifische» Dinitrophenylhydrazin-Methode nennenswerte Mengen von anderen Ketosäuren mit erfasst werden, die nicht der BTS entsprechen. Wir haben nach Abschluss der oben beschriebenen Überarbeitung des quantitativ-chromatographischen Verfahrens und Eliminierung der Fehlerquelle noch einige Blutwerte vergleichend direkt-kolorimetrisch und quantitativ chromatographisch bestimmt. Dabei haben wir die in Tabelle III zusammengestellten Werte erhalten. Hiernach zeigen die mit der direkten Kolorimetrie bestimmten Blutwerte für die BTS eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den auf quantitativ-chromatographischem Wege gewonnenen Werten. Voraussetzung für diese Übereinstimmung ist die Berücksichtigung der Ausbeute zugesetzter BTS-Mengen.

[1] S. Markees und F. Gey, Helv. physiol. Acta *11*, 49 (1953).

Tabelle III. Vergleich der direkten Kolorimetrie mit der quantitativen Chromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS im Blut. – Zusatz von Natriumpyruvat (34,1 γ/cm³ Blut = 30 γ reine Brenztraubensäure) zu Kaninchenvollblut:

Direkte kolorimetrische Methode

Kaninchen Nr.	Extinktion	Extinktion abzüglich Blutwert	Gefunden BTS, γ/cm³ im Blut*	Zusatzausbeute %	Vergleich der papierchromatographischen mit der direkten Methode
1	0,228		15,0	—	—
1+30	0,679	0,451			
2	0,402		26,6	—	—
2+30	0,860	0,458			
3	0,184		12,8	—	—
3+30	0,615	0,431			
4	0,192		13,2	—	—
4+30	0,629	0,437			
5	0,648		46,4	—	—
5+30	1,070	0,422			
6	0,456		28,4	—	—
6+30	0,940	0,484			
7	0,438		28,4	—	—
7+30	0,903	0,465			

Papierchromatographische Methode

1	0,160		10 5		
1+30	0,483	0,323	21,4	71	99
2	0,272		18,0		
2+30	0,586	0,314	21,6	72	94
3	0,108		12,2		
3+30	0,382	0,274	25,4	85	96
4	0,104		12,0		
4+30	0,374	0,270	24,5	82	91
5	0,441		47,6		
5+30	0,721	0,280	28,0	93	101
6	0,307		29,8		
6+30	0,615	0,308	24,0	80	105
7	0,287		29,6		
7+30	0,596	0,309	26,6	89	104

* Die Ungleichheit der in dieser Rubrik aufgeführten Extinktionswerte für die gleichbleibenden Zusatzmengen ist der Ausdruck der von Blut zu Blut etwas schwankenden Ausbeute von zugesetzter BTS. Da aber die Kurve der Extinktionswerte von BTS-Zusätzen in aufsteigenden Konzentrationen zum einzelnen Blut stets linear verläuft, ist die Bestimmung nur eines Wertes für die Festlegung ihrer Richtung ausreichend und zulässig. Die in der Nebenrubrik angegebenen Werte für die BTS im Blut sind jeweils auf einer derart angefertigten Kurve, die die Ausbeute berücksichtigt, abgelesen.

Wir dürfen als Endergebnis dieser langwierigen Nachprüfungen festhalten, dass, wie wir schon früher behauptet hatten, für Routine-Untersuchungen die rasch arbeitende direkte kolorimetrische Methode der BTS-Bestimmung mittels des 2,4-Dinitrophenylhydrazins ausreichend genau ist. Die Miterfassung anderer Ketosäuren spielt quantitativ keine wesentliche Rolle. Für sehr genaues Arbeiten, das die Ermittlung von Absolutwerten für die BTS erfordert, empfiehlt es sich, auch bei der direkten Kolorimetrie Zusätze von bekannten BTS-Mengen vorzunehmen, um die jeweils etwas schwankende Ausbeute kontrollieren und in Rechnung stellen zu können. – Im folgenden sei noch unser technisches Vorgehen beschrieben, das wir für die quantitative Papierchromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der BTS entwickelt haben.

Methode. 4 cm³ ungeronnenes Vollblut mit Zusatz von Liquemin werden mit 20 cm³ einer 10%igen Trichloressigsäurelösung enteiweisst und zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wird 5 min in kochendes Wasser gestellt und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt. 15 cm³ des Zentrifugates werden mit 2,5 cm³ einer 0,2%igen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt und 5 min zum Reagieren stehengelassen. Extraktion des Reaktionsgemisches mit 15 cm³ reinstem Toluol während 1 min unter Schütteln. Verwerfen der wässerigen Phase. Der Toluolextrakt wird mit wenig Wasser gewaschen, und die Wasserspuren werden durch Filtration entfernt. Eindampfen von 12 cm³ des Toluolextraktes im Vakuum bei rund 30° zur Trockne. Aufnehmen des Rückstandes in 4 cm³ Essigester, wovon 1 cm³ (= 0,5 cm³ Blut) mit Sicherheitspipette auf das Papier (Whatman Nr. 1) aufgetropft wird. Aufsteigende Chromatographie in mit 3%igem Ammoniak gesättigtem Butanol während 14 h. Trocknen des Papiers bei Zimmertemperatur, Abgrenzung der Flecken *A* und *B* in Form von für den Einzelversuch gleichbleibend grossen Rechtecken von etwa 3 × 4 cm, Ausschneiden und feines Zerschnitzeln. Gemeinsame Eluierung von *A* und *B* mit 8 cm³ einer 10%igen Natriumcarbonatlösung unter zweistündigem Schütteln bei Zimmertemperatur im verdunkelten Raum. Abnutschen und Zusatz von 1,5 cm³ einer *2n*-NaOH-Lösung zu 6 cm³ des Carbonatextraktes, Kolorimetrie nach etwa 2 min. Photometer: Lumetron, Filter 490. Schichtdicke 2 cm. Auswertung der gefundenen Extinktionen nach einer Standardkurve, die nach Zusatz bekannter Mengen von Natriumpyruvat zu Blut gewonnen wurde. Um Gamma pro Kubikzentimeter zu erhalten, muss mit $^8/_3$ multipliziert werden.

Herrn Dr. Kofler habe ich für die Beratung bei allen methodischen Fragen zu danken, Frl. R. Britt für die geschickte Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Summary

The accuracy of direct colorimetric estimation of pyruvic acid in the blood has been controlled by the quantitative chromatographic method. To do this it was indispensable to elaborate a new procedure for the quantitative chromatography, since without certain precautions there arose considerable losses owing to the sensitivity of the 2,4-dinitrophenylhydrazone of pyruvic acid to light, temperature, solvents or acids. Avoiding these possibilities of error there still remained a difference of about 20% between the two procedures which could be explained as the result of the formation of two isomers of 2,4-dinitrophenylhydrazone in addition to a smaller purely technical loss. This difference could be corrected by estimating the yield of known quantities of added pyruvate, and as a final result satisfactory agreement between the two methods has been achieved. The direct colorimetric estimation of pyruvic acid as 2,4-dinitrophenylhydrazone is sufficiently specific; it includes no appreciable quantities of other keto-acids and furnishes reliable values.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIN / BERGSTR.

Soeben erscheint:

FRITZ SEEL

Grundlagen der analytischen Chemie und der Chemie in wässrigen Systemen

1955. 348 Seiten mit 41 Abbildungen und 53 Tabellen.
In Leinen gebunden DM 29,–.

Dieses Buch stellt diejenigen Grundlagen der theoretischen Chemie zusammen, welche sich der Student zu eigen machen sollte, der während des anorganisch-chemischen Grundpraktikums analytisch arbeitet.
Es zeigt, daß man sich gerade während des analytischen Arbeitens nicht nur praktische, sondern auch theoretische Kenntnisse erwerben kann; sie schlagen nämlich eine Brücke zur physikalischen Chemie, die erfahrungsgemäß dem Studierenden besonders dann Schwierigkeiten bereitet, wenn er nicht gleich anfangs elementare physikalisch-chemische Gesetze und Denkmethoden kennen und anwenden lernt.

Prospekt mit Inhaltsübersicht auf Wunsch